

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ingeniería de las Tecnologías Industriales

Sistema electrónico de control de líquidos en recirculación para aplicaciones Lab on a Chip

Autor: Mario Cotorruelo Jiménez

Tutor: Francisco Perdigones Sánchez, Carmen Aracil Fernández

Dpto. Ingeniería Electrónica, Microsistemas
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019



Trabajo de Fin de Grado
Grado en Ingeniería de las Tecnologías Industriales

Sistema electrónico de control de líquidos en recirculación para aplicaciones Lab on a Chip

Autor:

Mario Cotorruelo Jiménez

Tutor:

Francisco Perdigones Sánchez, Carmen Aracil Fernández

Profesor contratado Doctor

Dpto. Ingeniería Electrónica, Microsistemas
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019

Trabajo de Fin de Grado: Sistema electrónico de control de líquidos en recirculación para aplicaciones Lab on a Chip

Autor: Mario Cotorruelo Jiménez

Tutor: Francisco Perdigones Sánchez, Carmen Aracil Fernández

El tribunal nombrado para juzgar el trabajo arriba indicado, compuesto por los siguientes profesores:

Presidente:

Vocal/es:

Secretario:

acuerdan otorgarle la calificación de:

El Secretario del Tribunal

Fecha:

Agradecimientos

Este trabajo supone un hito aparentemente inalcanzable al comenzar la carrera. Tras caerme un número incontable de veces, pero levantado incontables veces más una, ya se ve el final del camino (hacia los aún más costosos estudios de postgrado). Bromas aparte, este trabajo acaba un capítulo crítico de mi vida académica, el cual cierro con una buen sabor de boca.

Querría hacer especial mención a quienes me han animado cuando había vuelto a suspender esa asignatura de segundo (la cual no hace falta ni nombrar), quienes, tras dos o tres veces, seguían confiando en mí y en ese preciado 5 en las actas, quienes me han sacado de mi casa tras un examen que no me había salido demasiado bien y quienes han celebrado conmigo los exámenes aprobados y los 4,5 que te hacen media con las prácticas. Andrés Sr y Jr, Marta Sr y Jr, Ana, Rafa y Juli, Lili, Carlos, Fer, Pablo, Hugo, Manu, gracias por apoyarme. Os quiero.

A los que no son tan cercanos y aún así me han dado apoyo, a toda mi familia y a mis amigos, se que habéis estado conmigo en este tedioso episodio académico.

Por supuesto debo agradecer inmensamente a mi tutor Fran, que con su gran personalidad y humor ha hecho que ir a la ETSI a probar una vez más la placa no me suponga esfuerzo ninguno, sino todo lo contrario, motivación y ganas por sacar el proyecto a flote. Sin olvidar a Miguel, que me ha prestado su apoyo desde el primer día que aparecí por el laboratorio de microsistemas y que sin su trabajo prácticamente la mitad de este proyecto no habría sido posible. He de decir también que este proyecto ha sido lo más divertido y motivante que he llevado a cabo en la escuela: ver que horas y horas de trabajo y comeduras de cabeza dan resultado y cómo una idea en papel cobra vida en forma de pistas de cobre, cables, pegotes de estaño y tinta verde moviéndose a través una pieza de metacrilato.

Por último, no pueden faltar las gracias a todos mis compañeros que han sufrido conmigo y a todos los profesores que trabajan día a día para que todo esto sea posible. Gracias.

*Mario Cotorruelo Jiménez
Sevilla, 2019*

Resumen

A medida que avanza la tecnología PCB-MEMS y la microfluídica, las aptitudes de los dispositivos lab-on-a-chip aumentan en gran medida a la vez que el coste de producción se hace más bajo. Esta tecnología es una alternativa muy atractiva especialmente para los países en desarrollo, en los cuales el equipamiento de laboratorio es muy reducido y no da a basto para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades de gran parte de la población.

En esta obra se indaga en esta tecnología y se desarrolla un sistema de control de temperaturas e impulsión de líquidos para aplicaciones lab-on-a-chip, visto el potencial que ofrece este campo de la electrónica. En cuanto a la fabricación, se utilizan materiales de bajo coste y procesos de fabricación básicos, objeto imprescindible para la proliferación de este tipo de tecnologías. Tras el diseño de varios prototipos, se consiguió que el sistema llevara un volumen de $25\mu L$ a dos temperaturas distintas ($95^{\circ}C$ y $65^{\circ}C$) y que impulsase satisfactoriamente la muestra entre dos áreas en un PCB de pequeñas dimensiones.

Abstract

As the technology of PCB-MEMS and microfluidics advance, the suitability of lab-on-a-chip devices grow to a large degree as its production costs decline. This technology is a very attractive alternative specially for the developing countries, in which the laboratory equipment is very limited and doesn't provide illness diagnostics and treatment for the majority of the population.

This work gets into this technology and develops a temperature control and fluid impulsion system for lab-on-a-chip applications, given the potential that this field of electronics offer. As for the manufacture, low cost materials and basic manufacture processes are used, essential for the proliferation of this kind of technology. After several prototypes, the system was able to heat a volume of $25\mu L$ to two different temperatures ($95^{\circ}C$ and $65^{\circ}C$) and to successfully boost the fluid between two areas of a relatively small PCB.

Índice Abreviado

Agradecimientos	i
Resumen	iii
Abstract	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tablas	ix
1 Introducción y objetivos	1
2 Estado del arte	7
3 Diseño del Lab-on-PCB	17
4 Diseño del circuito electrónico de control de temperaturas	21
5 Definición y diseño del PCB de control de temperatura	31
6 Fabricación del sistema	37
7 Programación del microcontrolador	49
8 Pruebas de los distintos subsistemas	53
9 Conclusiones y trabajos futuros	57
10 Anexo	59
Bibliografía	65

Índice de Figuras

1.1	Compañías que han comercializado tecnología microfluídica, sus mayores productos y aplicaciones	2
1.2	Dispositivo de POC diagnostics desarrollado por Claros, Inc.	2
1.3	Esquema general del proyecto	4
1.4	Resultado del ensayo PCR a diferentes sets de temperatura	5
2.1	Representación gráfica del ensayo PCR	8
2.2	Bacteria <i>Thermus aquaticus</i>	9
2.3	Técnica de <i>Bulk Micromachining</i> usando litografía	10
2.4	Sensor de presión con tecnología PCB-MEMS	11
2.5	Principio de compensación de fuerzas	11
2.6	Circuito para la medición de la capacitancia y control	12
2.7	Característica del sensor compensado, en función de la temperatura y la humedad	12
2.8	Sección del dispositivo	13
2.9	Las dos capas del sensor, y su montaje	13
2.10	Estructura general del acelerómetro	13
2.11	Estructura de la plataforma microfluídica	14
2.12	Concepto del sistema de análisis y mezcla de fluidos por inyección	14
2.13	Vista cenital del PCB donde se efectúa la mezcla y el análisis	15
2.14	Posicionamiento tridimensional de los elementos fluidicos en el sistema	15
2.15	Señales en el sensor óptico de la concentración de iones de Fe(III)	15
2.16	Techne TC-3000	16
3.1	Diseño del microcanal	18
3.2	Curva de la NTC caracterizada	19
3.3	Pistas de calentamiento sobre microcanal. Cara superior	19
3.4	Pistas de las NTC sobre microcanal. Cara inferior	20
4.1	Circuito de control de temperaturas sin particularizar	21
4.2	Curva del rango de tensiones para 95°C	22
4.3	Circuito electrónico particularizado para 95°C	23
4.4	Resultados de la simulación para 95°C	23
4.5	Valores finales del circuito de 95°C	24
4.6	Resultados finales de la simulación a 95°C	25
4.7	Curva del rango de tensiones para 65°C	25
4.8	Circuito electrónico particularizado a 65°C	26
4.9	Resultados de la simulación para 65°C	26
4.10	Valores finales del circuito de 65°C	27
4.11	Resultados de la simulación finales para 65°C	27
4.12	Simulación del circuito con $R_{NTC}=10k\Omega$	28
4.13	Circuito de protección del microcontrolador	28
4.14	Simulación del circuito de protección	29

4.15	Pruebas de los circuitos de amplificación	30
5.1	Esquema general del sistema completo	31
5.2	Diagrama de bloques del funcionamiento de la placa central	32
5.3	Circuito de calentamiento	32
5.4	Esquemático del circuito de calentamiento para 65°C y 95°C respectivamente	32
5.5	Esquemático del PCB de control de temperatura	33
5.6	PCB de control de temperatura en 2D	34
5.7	Vista superior e inferior del PCB en 3d	35
6.1	Photoplotter	37
6.2	Fotolitos de las pistas de calentamiento y de las NTC	38
6.3	Circuito con zonas rellenas	39
6.4	Print preview	40
6.5	Máscaras del PCB de control de temperatura	40
6.6	Alineadora	41
6.7	Sosa caustica	42
6.8	Agua oxigenada y agua fuerte	43
6.9	PCB tras el revelado	44
6.10	Parte superior e inferior del PCB antes de ser perforado	44
6.11	PCB con todos los elementos soldados	44
6.12	Fresadora CNC	45
6.13	Recorrido de la broca desde el programa de fresado	46
6.14	Metacrilato del Lab-on-PCB sobre fondo gris	46
6.15	Fresado de los huecos en el PCB	47
6.16	Calentador del Lab-on-PCB	47
6.17	Detalle del soldado de la NTC en la cara posterior	48
7.1	Esquema PCB control temperatura	49
8.1	Diferencia de temperatura entre la marcada en el hot-plate y el termopar	53
8.2	Pruebas del calentador	55
8.3	Capturas de la cámara termográfica en las pistas de 95°C y 65°C	55
8.4	Sistema de inyección en fase de recocado y denaturación	56
8.5	Prueba del sistema completo	56

Índice de Tablas

4.1	Voltajes en el punto A y a la salida según temperatura	24
4.2	Voltajes en el punto A y a la salida según temperatura (ajustados)	25
4.3	Voltajes en el punto A y a la salida según temperatura	26
4.4	Voltajes en el punto A y a la salida según temperatura (ajustados)	27
4.5	Comparación de voltajes (65°C) de simulación y placa de pruebas	29
4.6	Comparación de voltajes (95°C) de simulación y placa de pruebas	30
5.1	Lista de componentes electrónicos con su precio unitario y total	36
7.1	Tabla de estados del programa de control de temperatura	51
7.2	Tabla de los pines usados	52

1 Introducción y objetivos

1.1 Motivación y contexto social-económico

La microfluídica es una tecnología emergente que permite la automatización y la multiplexación de equipo de laboratorio, análisis de muestras biológicas y dispositivos de diagnóstico in-vitro, por nombrar unas pocas de sus aplicaciones [17]. En los pasados 20 años un número considerable de empresas han apostado por la comercialización de la tecnología microfluídica. Inicialmente, estos dispositivos estaban pensados para ser usados en análisis biológicos y para la creación de componentes químicos en volúmenes bajos, de manera que un rango de sustancias se preparasen y analizasen a pequeña escala (bajo volumen) para así sustituir los procesos manuales y el equipamiento de laboratorio tradicional. Las empresas pioneras en hacer esto creen en que la consumición eficiente de reactivos, la miniaturización de componentes, y el bajo coste de producción de los dispositivos microfluídicos reducirán notablemente los costes en comparación con el equipamiento tradicional de laboratorio [5]. Aún con estas ventajas, muchas empresas optan por el equipo tradicional de laboratorio debido a algunos inconvenientes como la dificultad de sincronización con el hardware asociado, como por ejemplo bombas externas y demás elementos de control de fluidos, además de la formación necesaria para el uso de estos nuevos dispositivos. Por ello, tiene que haber una ventaja operacional razonable y/o una disminución significativa del coste para que los usuarios den el paso a adoptar esta nueva tecnología. Esta ventaja se ha hecho más aparente en dos campos clave de la biotecnología: la genómica y el diagnóstico point-of-care (POC) [24]. (Ver Figura 1.1).

En 2017, el mercado de la microfluídica se encontraba valorado en 4.552 billones de dólares. Con una tasa de crecimiento anual compuesta del 17.45 %, se prevé que alcance un valor de 111.95 billones de dólares para 2023 [3]. Este rápido crecimiento se debe a los avances en la biotecnología, más en concreto la secuenciación de genes y el diagnóstico point-of-care (POC).

- **Secuenciación de genes.** Con la finalización del proyecto genoma humano en 2003 y con la llegada de la secuenciación de nueva generación, la tecnología microfluídica ha sido usada para aumentar la automatización y disminuir los tiempos necesarios para los procesos en la genómica. Dos compañías clave en el campo de la genómica microfluídica son Illumina Inc. Y Fluidigm Corp. En 2013, Illumina adquiere Advanced Liquid Logic Inc. para ganar acceso a su plataforma de microfluídica digital. Su tecnología de electrowetting manipula gotas individualmente en un dispositivo sin necesidad de válvulas, bombas o canales; por tanto, estos dispositivos tienen el potencial de ofrecer soluciones a uno de los inconvenientes ya citados [16]. Por otro lado, Fluidigm se fundó para comercializar el circuito fluido integrado (o integrated fluidic circuit (IFC) en denominación anglosajona) basado en una válvula neumática de goma, diseñada en el laboratorio de Stephen Quake [6]. Con esta tecnología, Fluidigm se convirtió en la primera compañía en comercializar un PCR digital en 2006.
- **Diagnóstico Point-of-care (POC).** A este campo también le ha sido económicamente favorable la tecnología microfluídica. Grandes empresas farmacéuticas han adoptado a sus plataformas de diagnóstico dispositivos POC lab-on-a-chip. Por ejemplo, la compañía Abbott Laboratories comercializa el sistema i-STAT, un dispositivo de mano que integra microfluídica y electroquímica para analizar químicamente muestras de sangre [8]. Por otro lado, Claros Diagnostics Inc. ha desarrollado un dispositivo microfluídico que lee un componente desechable del tamaño de una tarjeta de crédito donde se introduce una muestra de sangre, la cual es sometida a diferentes análisis de infecciones urinarias y demás enfermedades [12] (Ver Figura 1.2). La compañía ha usado esta tecnología, en conjunto con sus

Company name	Major products	Applications	Founded/ acquired	Country
Roche Diagnostics	Genome Sequencer FLX System, LightCycler Systems, Cedex HiRes	Genotyping, microarray analysis, cell analysis	1896	Switzerland and US
Advanced Liquid Logic, Inc. (acquired by Illumina)	NeoPrep Library Prep System	Next-generation sequencing	1998/2013	US
i-STAT Corp. (acquired by Abbott Laboratories)	i-STAT Systems	POC diagnostics	1983/2004	US
Agilent Technologies	2100 Bioanalyzer	Human diseases, genomics	1999	US
Danaher Corporation	Original equipment manufacturer	Manufacturing for life sciences and diagnostics	1969	US
Caliper Life Sciences (acquired by PerkinElmer)	LabChip Systems	Diagnostics, molecular testing	1995/2011	US
Life Technologies Corporation (acquired by Thermo Fisher)	TaqMan Assays	Genotyping, diagnostics, drug discovery	1983/2013	US
Cepheid	Xpert and GeneXpert Systems	Diagnostics	1996	US
Fluidigm Corporation	BioMark HD System, C1 System, EP1 System	Genotyping and sequencing	1999	US
RainDance Technologies	RainDrop System, ThunderStorm System	Genotyping and sequencing	2004	US
Claros Diagnostics (acquired by OPKO)	Prostate-Specific Antigen (Total PSA) Test 4KScore Prostate Cancer Test	POC diagnostics	2005/2011	US
Gyros AB	Gyrolab xP Workstation, Gyrolab Bioaffy CDs, Gyrolab Mixing CD	Immunoassays, biomarker monitoring, drug analysis	2000	Sweden
Micronit Microfluidics	Microreactors, Micromixers, Droplet Generators, Chip Electrophoresis	Manufacturing custom microfluidic devices	1999	Netherlands
Dolomite Microfluidics	Multiflux	Manufacturing custom microfluidic devices	2005	UK
Sphere Fluidics Ltd.	Pico-Gen Picodroplet Formation Chips	Human diseases, drug discovery, biomarker analyses	2010	UK

Figura 1.1 Compañías que han comercializado tecnología microfluídica, sus mayores productos y aplicaciones.

biomarcadores propios, como por ejemplo sus ensayos basados en anticuerpos, para el diagnóstico prematuro de enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson [7].



Figura 1.2 Dispositivo de POC diagnostics desarrollado por Claros, Inc. .

No es por la novedad tecnológica, sino por el sentido práctico y bajo coste de estos dispositivos, por lo que esta tecnología tiene el potencial de resolver problemas clínicos de gran magnitud, sobre todo en países en desarrollo. Con el objetivo de llevar pruebas de diagnóstico de alta fiabilidad a partes de la población donde los recursos están especialmente limitados, Daktari Diagnostics Inc. ha utilizado tecnología lab-on-a-chip para integrar la preparación de la muestra y su análisis en un mismo dispositivo. Este dispositivo incorpora un contador diferencial microfluídico, el cual es capaz de cuantificar el número de células inmunes CD4+ o CD8+ presentes en una muestra de un espécimen [25]. Con una precisión comparable a la de los dispositivos convencionales de citometría de flujo, este dispositivo tiene el potencial de reducir sustancialmente los

costes del diagnóstico del VIH [24]. Es este amplio abanico de aplicaciones y el potencial de la tecnología microfluídica y lab-on-a-chip lo que motiva al desarrollo de este (y otros tantos en la escuela) proyecto fin de grado.

1.2 Objetivo principal

El objetivo final de este proyecto es el desarrollo de un termociclador para amplificación de ADN mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este proyecto se encarga del control de líquidos en recirculación, más concretamente de su temperatura, siendo a su vez parte de un proyecto mayor el cual lleva el departamento de Microsistemas de la escuela. En este proyecto mayor se hace la otra parte del control: el control de impulsión. La unión de ambos proyectos pretende ser capaz de llevar a cabo el ensayo del PCR de forma satisfactoria. La idea es llevar a cabo dicho ensayo en un dispositivo modular y de tamaño reducido, es decir, que pueda ser considerado un dispositivo Lab-on-a-chip. Este constará de dos temperaturas, a diferencia de los termocicladores dedicados al ensayo convencionales, los cuales tienen tres. (Ver Sección 1.4) La simplicidad en el diseño del dispositivo es una prioridad, así como que el dispositivo tenga el menor coste posible, mediante el uso de materiales como metacrilato, FR4, cobre, etc. Además de los materiales, se buscan también procesos de fabricación estándar, como el *wet etching* o el procesado termoplástico mediante el uso de una fresadora CNC. El requisito final del proyecto, aunque también el más obvio, es que lleve a cabo su función: la amplificación de muestras de ADN. Para ello se han de definir unos requisitos y unas tareas asociadas a ellos.

1.3 Requisitos y tareas

Se parte de unos requisitos base, los cuales se enlistan a continuación:

- Volumen de la muestra: $25\mu\text{L}$
- Temperatura 1: $95^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Temperatura 2: $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Área del metacrilato (por el que circulará la muestra): $64 \times 64 \text{mm}^2$
- Área del PCB (el que contendrá y calentará la muestra): $68 \times 68 \text{mm}^2$
- Espesor del metacrilato: 5mm^2
- Sección del canal microfluídico: $1 \times 1 \text{mm}^2$

Los requisitos dimensionales se deben a que el proyecto sea compatible con la carcasa dedicada al desarrollo de dispositivos lab-on-a-chip ya fabricada previamente en el departamento de microsistemas de la escuela.

En el desarrollo del proyecto se diferencian cuatro elementos principales, los cuales deberán llevar a cabo el objetivo principal con los requisitos listados arriba. La figura a continuación muestra estos cuatro elementos y la interacción entre ellos.

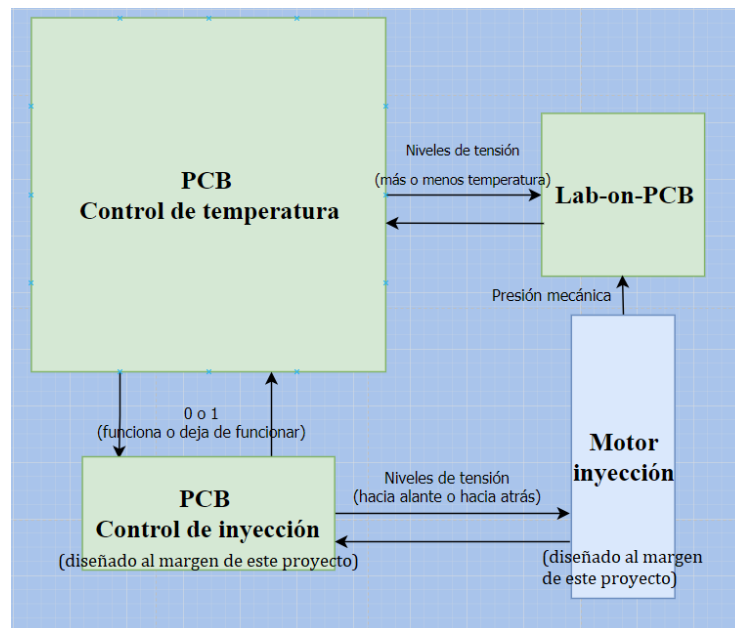


Figura 1.3 Esquema general del proyecto.

El Lab-on-PCB será el chip de $68 \times 68 \text{ mm}^2$ donde se realizará el ensayo en sí: constará de un canal microfluídico por donde circulará la muestra, será responsable del calentamiento asociado al termociclador y de la medida de la temperatura de la muestra. Para la microfluídica puede usarse un panel de PMMA, para el calentamiento unas pistas de cobre en serpentín y para la medición de la temperatura un par de NTCs.

A parte del Lab-on-PCB, se diseñará un PCB (de mayores dimensiones) responsable del control de la temperatura, con dos circuitos de amplificación (uno para cada temperatura), el microcontrolador (en este caso se usará el MSP430G2553 debido a su versatilidad, y que sus especificaciones van de sobra para la electrónica necesaria), circuito de acondicionamiento de señal, y el circuito responsable del calentamiento.

También perteneciente al sistema, pero no parte de este trabajo, está el sistema de impulsión. Éste consta de un PCB propio para su electrónica, con su propio microcontrolador. Para la impulsión se ha diseñado en el departamento un sistema constituido por una jeringa acomodada en una estructura (fabricada con impresora 3D), cuyo émbolo es impulsado con un motor, permitiendo una inyección de fluido de manera controlada y fiable.

Para llevar a cabo el proyecto, se llevaron a cabo las tareas en este orden:

- **Diseño del Lab-on-PCB.** Esto implica el diseño del canal microfluídico, las pistas de calentamiento y el posicionamiento de las NTC.
- **Diseño del circuito electrónico responsable del control de temperatura.** Se llevará a cabo el dimensionamiento de resistencias para cada uno de los dos circuitos y la simulación de los resultados.
- **Diseño del PCB de control de temperatura.** Incluyendo este el circuito anterior, el circuito de calentamiento, el circuito de protección y el microcontrolador.
- **Fabricación del circuito electrónico completo.** Tanto el Lab-on-PCB como el PCB de control de temperatura.
- **Programación del microcontrolador.** Deberá coordinar el control de temperatura y comunicarse con el sistema de inyección.
- **Pruebas del dispositivo completo**

1.4 Resultados previos

Normalmente, para obtener el mayor número de copias de ADN los termocicladores usados para el ensayo del PCR suelen ser de tres temperaturas. Sin embargo, es posible realizar el ensayo con dos temperaturas para el ADN de ciertas especies, como por ejemplo la del ratón. A continuación se muestra el resultado del ensayo

en cuatro grupos de temperaturas; de izquierda a derecha son 95-58-72°C, 95-62-72°C, 95-58°C y 95-65°C, realizado en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS).

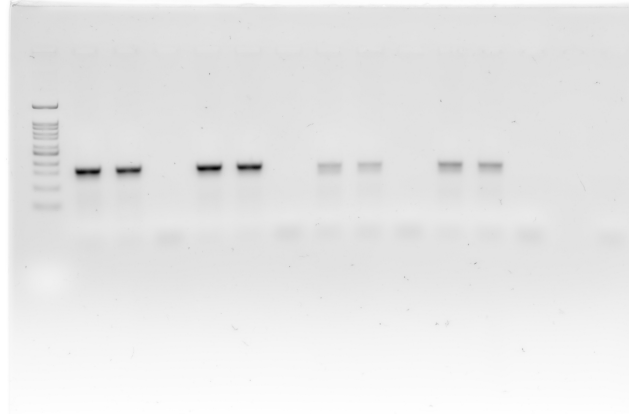


Figura 1.4 Resultado del ensayo PCR a diferentes sets de temperatura.

La intensidad muestra el grado de amplificación de ADN, y como se aprecia en la figura, la amplificación en el cuarto ensayo es la de mayor intensidad para dos temperaturas. Este es el resultado que se espera replicar con este sistema.

2 Estado del arte

2.1 Introducción

En este capítulo se detallarán más los conceptos de PCR (Polymerase Chain Reaction) y de PCB-MEMS. En primer lugar, se dará la definición de PCR y se explicará su funcionamiento, seguido de un poco de contexto histórico para entender su origen, las tecnologías que han permitido su desarrollo y el futuro de este dispositivo. En segundo lugar, se expondrán los conceptos de MEMS y PCB-MEMS, dando su definición y varias aplicaciones microfluidicas, para después dar ideas de cómo integrar la tecnología microfluídica y MEMS en el ensayo de amplificación del ADN.

2.2 PCR

2.2.1 Definición y funcionamiento

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), se trata de un simple ensayo enzimático, el cual permite la amplificación de un fragmento de ADN específico partiendo de una muestra de ADN compleja. El doctor Kary Mullis, quien descubrió el ensayo, dijo “te permite elegir el fragmento de ADN en el que estás interesado y divertirse cuanto quieras con ella” [15]. El ensayo puede ser realizado usando ADN procedente de una gran variedad de tejidos y organismos, incluyendo sangre periférica, piel, pelo, saliva y microbios. Sólo una pequeña muestra de ADN es necesaria para que el PCR genere copias suficientes para ser analizadas usando métodos de laboratorio convencional. Por esto mismo, el PCR es un ensayo sensible. Cada ensayo de PCR requiere de una **muestra de ADN**, **cebadores de ADN** (secuencia corta de ADN (entre 18 y 22 bases) que sirve como punto de partida para la síntesis de ADN. Es necesario ya que las enzimas que catalizan el proceso, polimerasas de ADN, sólo pueden añadir nucleótidos a cadenas de ADN ya existentes), **nucleótidos** (incluyendo las cuatro bases: adenina, citosina, timina y guanina; ACTG) y **polimerasa de ADN resistente al calor**, para hacer las nuevas copias. Los nucleótidos actúan como las unidades de construcción que usa la polimerasa de ADN para crear el producto resultante. Los cebadores de ADN especifican el fragmento de ADN exacto a ser amplificado. La mezcla con los elementos anteriormente mencionados se introduce en un dispositivo, básicamente un termociclador, el cual lleva a cabo sucesivos ciclos de amplificación llevando la mezcla a tres temperaturas diferentes. Se diferencian tres fases en cada ciclo:

- **1-Denaturación.** 95°C. La solución se lleva a la temperatura de fusión para que las hebras de ADN se separen. El ADN entonces queda como una cadena simple.
- **2-Recocido.** 55°C. La solución se enfría, haciendo que los partidores de ADN se unan a las regiones específicas de ADN de interés. El recocido sólo se lleva a cabo si los partidores y la región de ADN son complementarias en secuencia.
- **3-Extensión.** 72°C. La mezcla vuelve a calentarse para que la polimerasa de ADN se una y sintetice una nueva cadena de ADN. Se eleva a una temperatura a la cual la polimerasa de ADN es capaz de extender los partidores añadiendo nucleótidos a la cadena de ADN en desarrollo. Con cada repetición de estos tres pasos, el número de copias de ADN se dobla. El proceso suele repetirse unas 30 veces, suele tardar alrededor de 3h y crea unas 10^9 copias [10]. A continuación se deja una imagen que ilustra lo que le sucede a la cadena de ADN en cada ciclo [10].

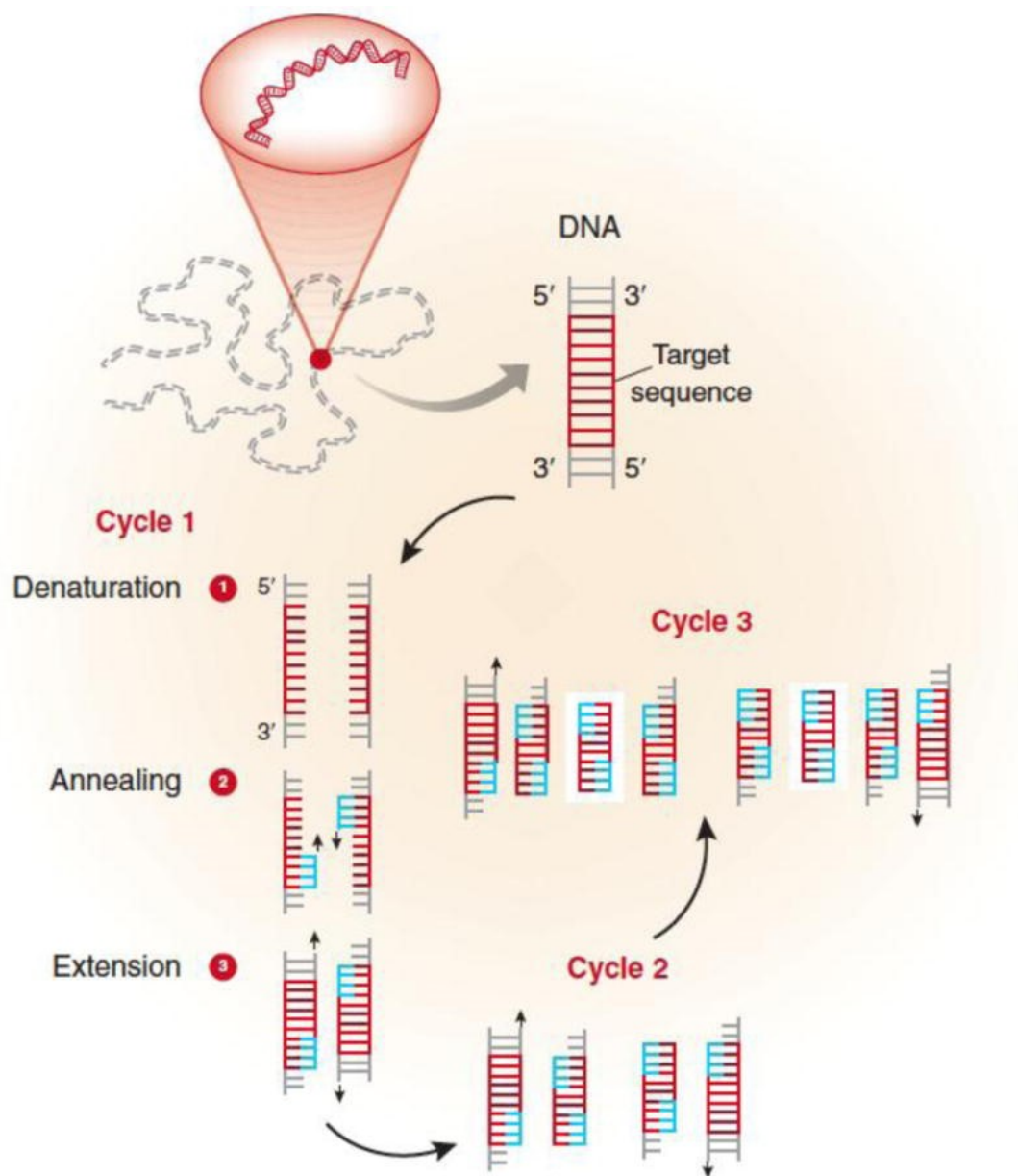


Figura 2.1 Representación gráfica del ensayo PCR.

2.2.2 Historia

En 1983, Kary Mullis, PhD, un científico de la empresa Cetus Corporation, concibió el PCR como un método para copiar ADN y sintetizar grandes cantidades de una región específica de ADN. Durante los siguientes dos años, un equipo de científicos de Cetus que reconocieron el gran potencial que el ensayo podría tener en la doctrina de la biología molecular, investigaron, refinaron e hicieron el proceso teórico realidad. El equipo de científicos presentó por primera vez en 1985 en la reunión anual de la Sociedad Americana para Genética Humana (ASHG) [18]. Ese mismo año, Science, una revista de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia (AAAS), publicaron por primera vez los resultados del ensayo. El ensayo PCR fue galardonado con el Premio Nobel en Química en 1993. Los dos avances científicos permitieron al PCR convertirse en la tecnología que es hoy: la polimerasa taq (polimerasa termoestable) y el termociclador. En 1986, los científicos de Cetus aislaron la polimerasa taq del *Thermus aquaticus*, una bacteria encontrada en aguas termales. Al ser la polimerasa térmicamente resistente, hace que no sea necesario intervención humana en la reacción [20], acortando y optimizando el proceso. Sin una polimerasa termorresistente, el ensayo no podría usarse a gran escala y el proceso habría sido demasiado enrevesado. Antes de descubrirse la polimerasa taq, se usaba una polimerasa procedente de

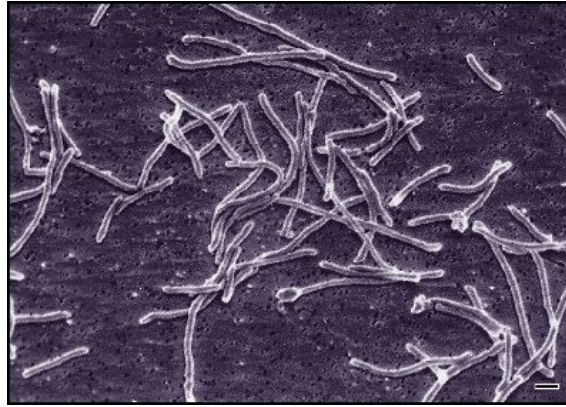


Figura 2.2 Bacteria *Thermus aquaticus*.

la bacteria *E. coli*., la cual no resistía el cambio rápido de temperaturas, se usaba en el segundo paso del PCR. Usando la polimerasa de la *E. Coli*, tenía que ser repuesta en cada ciclo manualmente ya que ésta se degradaba con el calor [19]. En 1987, PerkinElmer, otra empresa estadounidense dedicada a la biotecnología, lanzó al mercado el termociclador, un instrumento programado para regular la temperatura de una reacción, calentando o enfriando las muestras tanto como se necesitase. De nuevo, este avance disminuyó aún más la intervención humana en el proceso, convirtiéndose así en un proceso elegante, eficiente y sencillo.

2.3 MEMS

2.3.1 Definición

Los Sistemas Micro-Electro-Mecánicos o Micro-Electro-Mechanical-Systems en inglés, es la integración de un número de microcomponentes en un solo chip, lo cual permite al microsistema tanto percibir el entorno como actuar sobre el, así como procesamiento de datos y comunicación entre dispositivos. Los componentes normalmente incluyen circuitos microelectrónicos integrados (el “cerebro”), sensores (los “sentidos” y el “sistema nervioso”), y los actuadores (los “brazos” o las “manos”) [2]. Los tipos de MEMS varían desde dispositivos relativamente simples sin partes móviles, hasta sistemas electromecánicos muy complejos en los que varios elementos se mueven bajo el control de la electrónica integrada [21].

2.3.2 Fabricación

La fabricación de los dispositivos MEMS implica métodos de fabricación de circuitos integrados, así como procesos de micromachining implicando eliminación selectiva de silicio o adición de otras capas estructurales. A continuación se explica la técnica de Bulk micromachining, una técnica muy usada para la fabricación de MEMS pero no la única.

- **Paso 1:** El primer paso implica el diseño del circuito y el dibujado del mismo en un papel o en un software como PSpice o MicroCap.
- **Paso 2:** El segundo paso implica la simulación del circuito y el modelado usando un software CAD. De este programa salen las máscaras fotolitográficas, que se usan para proteger las zonas del circuito que no interesan que sean insoladas con UV.
- **Paso 3:** En el tercer paso se usa la fotolitografía. En este paso, una fina capa de material aislante como Dióxido de Silicio se deposita sobre el sustrato de silicio y sobre esto una capa orgánica, sensible a rayos ultravioleta, es depositada usando la técnica de *spin coating*, la cual consiste en la deposición de una gota de esta sustancia en el centro de la oblea, y usando una máquina rotatoria se lleva a una velocidad determinada dependiendo del grosor de la capa deseada; esparciéndose la gota alrededor de toda la oblea. La máscara fotolitográfica se sitúa encima del componente orgánico, para que cuando se someta éste a la insolación (exposición a rayos UV), el patrón de la máscara se transfiera a la capa orgánica. La radiación puede reforzar la capa orgánica o debilitarla.

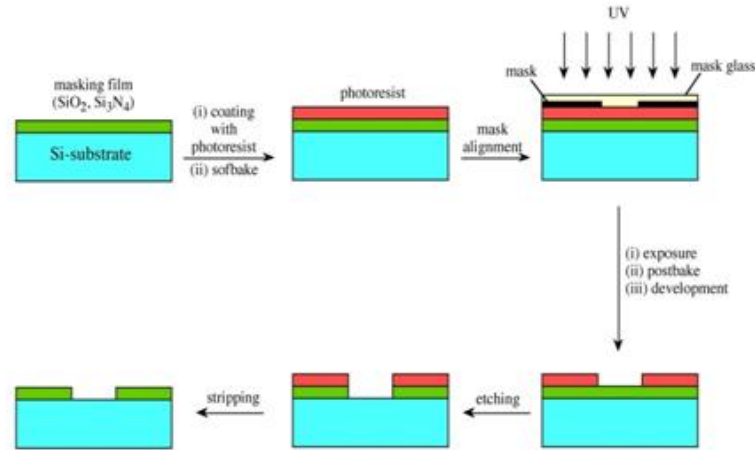


Figura 2.3 Técnica de *Bulk Micromachining* usando litografía.

La parte que queda sin cubrir se elimina usando ácido clorhídrico. La resina restante se elimina utilizando acetona y lo resultante es un patrón en el sustrato, procedente de la máscara.

- **Paso 4:** En el cuarto paso comienza la eliminación del silicio, o *etching*. Puede ser tanto *dry etching* como *wet etching*, dependiendo del compuesto que se utilice para su eliminación. En el *wet etching*, el sustrato es inmerso en un ácido que ataca la parte no cubierta de óxido, y el ataque puede ser isotrópico (igual en todas las direcciones) o anisotrópico (en una dirección particular). Los ácidos más utilizados son ácido acético e hidróxido de potasio.
- **Paso 5:** El quinto paso implica la unión de dos o más obleas para producir una oblea multicapa o una estructura 3D. Puede hacerse usando *fusion bonding*, una técnica que implica la unión directa entre las capas o usando unión anódica.
- **Paso 6:** El siguiente paso puede ser tanto la repetición de alguno de los pasos anteriores para continuar la creación de capas en el silicio, o puede procederse a la integración del MEMS en el chip.
- **Paso 7:** Tras la integración del MEMS, es usual realizar un encapsulado para asegurar la protección del circuito de los agentes externos como el polvo, golpes, o interferencias electromagnéticas. Algunos de los encapsulados más usuales son de metal o de cerámica. El chip entonces se conecta a los pines del encapsulado usando *wire bonding*, en el cual un pequeño cable (usualmente de oro) forma la conexión entre el sustrato y el chip [1].

2.3.3 PCB MEMS y aplicaciones

Los PCB-MEMS son microsistemas fabricados mediante materiales empleados en la tecnología de circuitos impresos [13]. El sustrato de partida suele ser FR4 (Fire Retardant en inglés) en lugar de silicio (el sustrato utilizado en la tecnología convencional) dado su bajo coste, su fácil adquisición y sobretodo a su facilidad para ser mecanizado. Se añaden pasos extra en el proceso de fabricación PC para crear estructuras MEMS. La utilización de este sustrato frente al silicio tiene ciertas ventajas, las cuales se enlistan a continuación:

- * Proceso de fabricación mucho más simple y barato que la tecnología de silicio.
- * Rápido prototipado, debido a su facilidad para ser mecanizado
- * Total integración de componentes electrónicos y fluidicos en un mismo PCB.
- * Fácil integración de la electrónica y fluidica, haciendo posible el diseño de dispositivos monolíticos que manipulan, analizan y controlan fluidos todo en un mismo chip, conectado mediante pistas de cobre. (Ideal para aplicaciones biológicas, químicas, médicas...)
- * Eliminación de la etapa de *Wire Bonding*, gracias a las técnicas de fotolitografía y deposición de materiales conductores que permiten establecer continuidad eléctrica entre los MEMS y el cobre [23].

2.3.4 Sensor de presión

Un elemento interesante para demostrar cómo es posible resolver problemas asociados a materiales es el desarrollo de un sensor de presión con tecnología PCB-MEMS. La Figura 2.4 muestra la construcción del sensor.

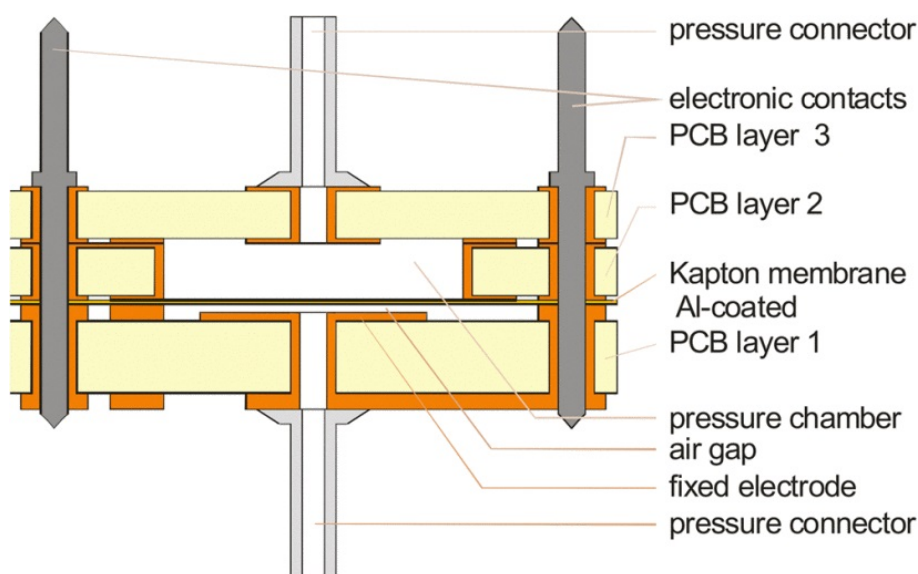


Figura 2.4 Sensor de presión con tecnología PCB-MEMS.

Los parámetros mecánicos como el módulo de elasticidad y la expansión linear del FR4 son dependientes de la temperatura y de la humedad, y estos modifican drásticamente el comportamiento del sensor, lo cual no es aceptable.

Es posible solventar este problema evitando el movimiento de la membrana. La idea es compensar la presión mecánica derivada de la deformación con fuerza electrostática.

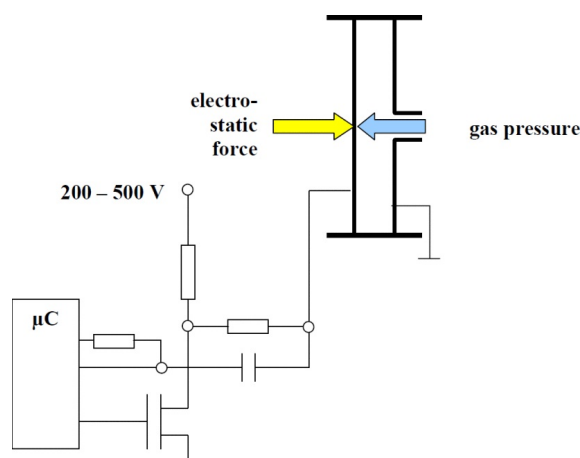


Figura 2.5 Principio de compensación de fuerzas.

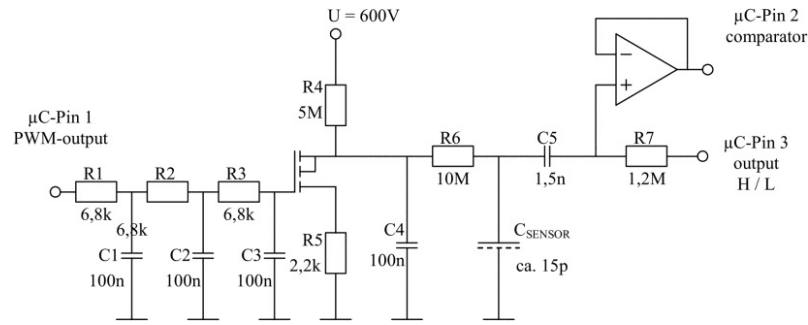


Figura 2.6 Circuito para la medición de la capacitancia y control.

La Figura 2.5 muestra el principio de operación y la Figura 2.6 el circuito electrónico en detalle. El movimiento de la membrana es definido por el error del control de la electrónica de control. Con esta configuración, la influencia de la temperatura y la humedad se elimina. El método se evalúa midiendo la curva característica bajo distintas condiciones.

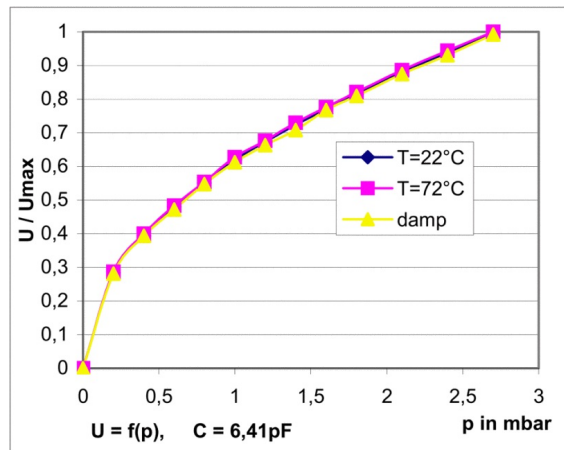


Figura 2.7 Característica del sensor compensado, en función de la temperatura y la humedad.

La Figura 2.7 muestra los resultados.

2.3.5 Sensor de presión capacitivo que usa el espesor del cobre como *gap* del condensador

Esta aplicación es otro ejemplo del potencial de la tecnología PCB-MEMS. En este sensor, el *gap* entre los electrodos se define como el grosor de la capa de cobre de los PCBs comerciales. Este prototipo está compuesto de un PCB superior, el cual incluye una membrana de SU-8 utilizando oro como un electrodo móvil, y un PCB inferior que forma el *gap* junto con otro electrodo móvil de oro.

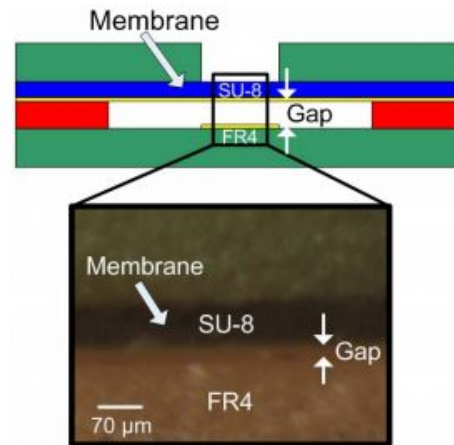


Figura 2.8 Sección del dispositivo.

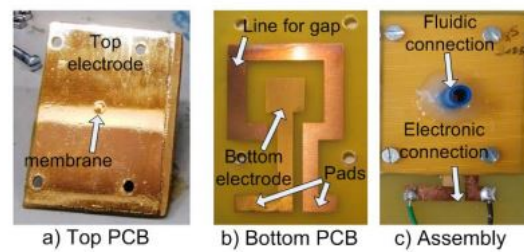


Figura 2.9 Las dos capas del sensor, y su montaje.

El sensor ha sido caracterizado experimentalmente, y este proporciona una sensibilidad de 20.13 fF/mBar [22].

2.3.6 Acelerómetro de un eje fabricado con tecnología PCB-MEMS

Para los casos en los que unas prestaciones excelentes no son prioridad, podrían usarse acelerómetros de bajo coste. Esta aplicación presenta un acelerómetro de un eje fabricado con tecnología PCB-MEMS y ablación láser. El láser se usa para quitar parte del sustrato del PCB, dejando suspendida una masa sujeta por voladizos de cobre.

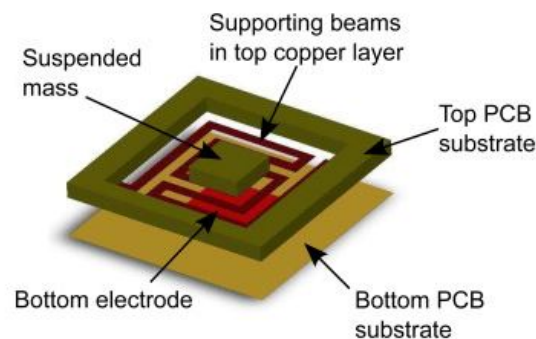


Figura 2.10 Estructura general del acelerómetro.

La estructura se conecta fácilmente con otro PCB, creando así un condensador entre ambos

PCB con el pequeño espacio entre ellos. La capacitancia varía con el movimiento relativo de uno de ellos, causado por aceleración externa. El acelerómetro fabricado se comparó con uno de silicio, y ambas medidas muestran la misma tendencia. La sensibilidad del acelerómetro se midió y resultó ser $81 fF/g$ [14].

2.3.7 Plataforma Lab-on-PCB portátil para micromezclado autónomo con SU-8

El uso de cámaras de aire presurizadas y microválvulas controladas permiten la impulsión de muestras fluidicas para un mezclado autónomo, evitando el uso de bombas externas y mejorando así la portabilidad. La plataforma se fabrica utilizando FR4 como sustrato de PCB, cobre para las pistas y pads, y SU-8 para el circuito microfluídico.

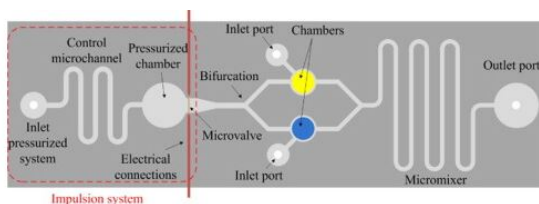


Figura 2.11 Estructura de la plataforma microfluídica.

La funcionalidad de la plataforma incluye el almacenamiento de presión para propulsar y mezclar los fluidos, además, el dispositivo está diseñado para ser desechable y así evitar contaminación y condiciones no sanitarias en la mezcla; el bajo coste de la solución propuesta es un logro importante [4].

m

2.3.8 Análisis y mezcla de fluidos por inyección

Este sistema, que ha sido desarrollado y testado, demuestra la habilidad de la microfluídica basada en la tecnología PCB-MEMS. A continuación se muestra el concepto del sistema.

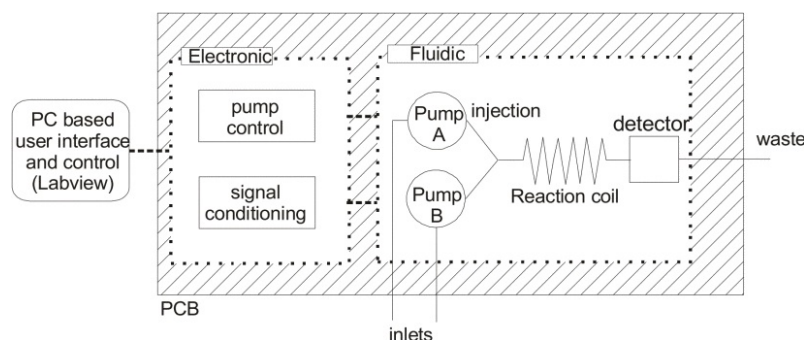
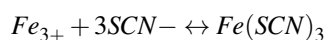


Figura 2.12 Concepto del sistema de análisis y mezcla de fluidos por inyección.

La bomba A lleva el fluido de muestra. La bomba B lleva el reactivo. La mezcla y la reacción se llevan a cabo en el Reaction coil. Al final de éste, un sensor óptico mide la densidad de la reacción. El sistema fluídico se lleva a cabo en un PCB de 4 capas. La electrónica para el control de las bombas y para el acondicionamiento de la señal se sitúan en capas distintas. La Figura 2.13 muestra la vista en planta de una primera versión. El posicionamiento de los elementos dentro del PCB en sus distintas capas se muestra en la Figura 2.14

El sistema es testado bajo condiciones de laboratorio usando la reacción química



Esta reacción química influye en el color de la mezcla del fluido. Vale para la detección de iones de Fe(III) en el agua. En la Figura 2.16 se muestra el resultado de un análisis de este dispositivo [9].

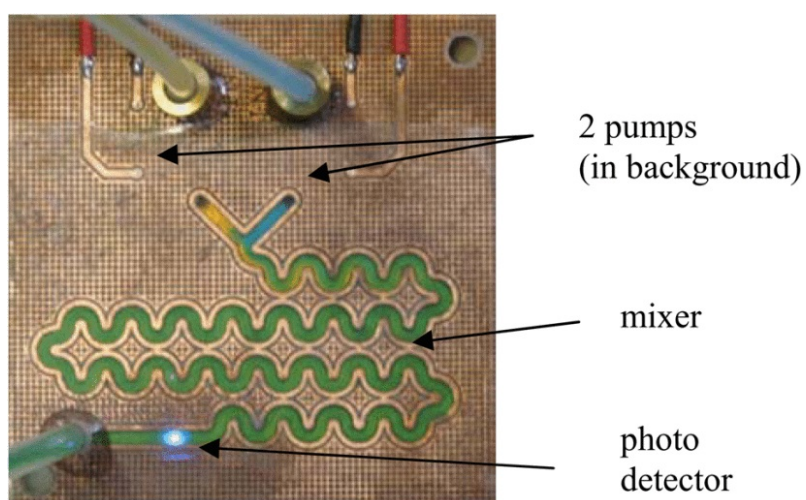


Figura 2.13 Vista cenital del PCB donde se efectúa la mezcla y el análisis.

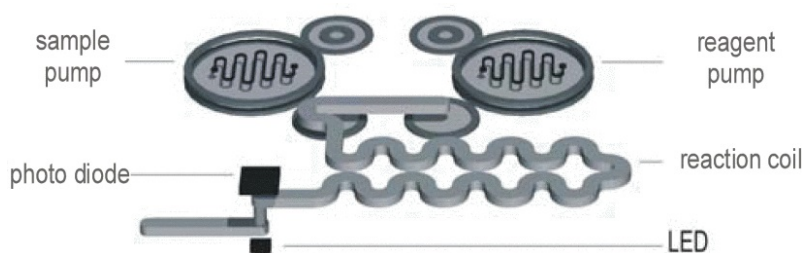


Figura 2.14 Posicionamiento tridimensional de los elementos fluídicos en el sistema.

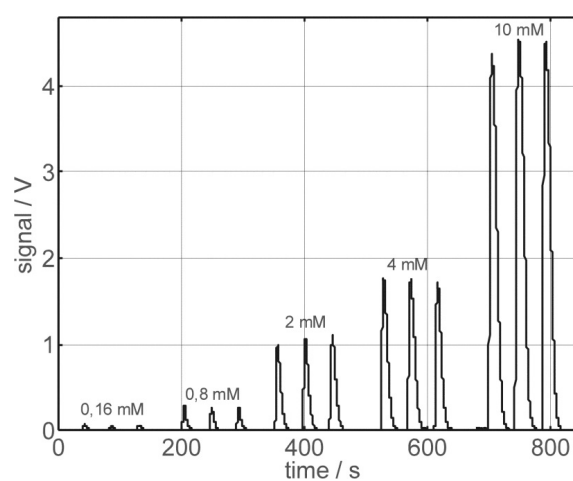


Figura 2.15 Señales en el sensor óptico de la concentración de iones de Fe(III).

2.3.9 Termocicladores actuales

Como ejemplo de los termocicladores ya existentes en el mercado, se presenta a continuación un termociclador de laboratorio comercial, *Techne TC-3000*.

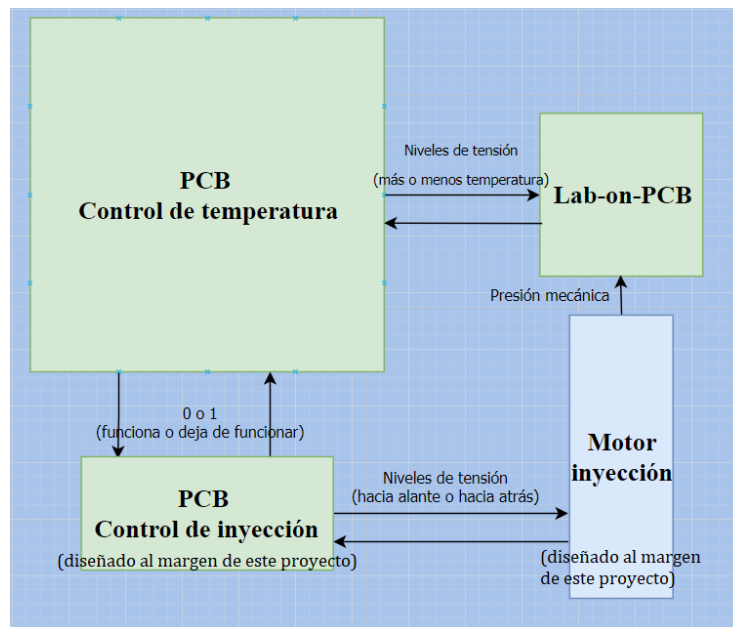


Figura 2.16 Techne TC-3000.

Este termociclador abarca un rango de temperaturas de 4°C a 99°C y tiene una precisión de 0.1°C. El precio de este instrumento es de 5000€, y fue el usado en el laboratorio del CITIUS para el análisis del que se habla en la sección de Resultados previos **Ver Sección 1.4**.

3 Diseño del Lab-on-PCB

El *Lab-on-PCB* se compone de tres elementos principales: el microcanal por donde circulará la muestra, fabricado con PMMA, las pistas de los calentadores y las pistas de las NTC, cada uno en una cara del PCB.



Por tanto, el Lab-on-PCB es el elemento que inicia y cierra el bucle, ya que en él se encuentra la medida de la temperatura (circuito de las NTC) y el regulador de la temperatura (pistas de calentamiento). El valor de resistencia de la NTC dará un valor de tensión asociado en el circuito de amplificación en el PCB de control de temperatura, que se traducirá en una onda modulada por anchos de pulso (PWM) que entrará en el circuito de calentamiento, regulando así la temperatura en las pistas de calentamiento del Lab-on-PCB. En primer lugar se entrará en el diseño del microcanal de PMMA.

3.1 Diseño del microcanal en PMMA

Para el diseño del microcanal se debe tener en cuenta una serie de requisitos: en primer lugar, el espacio es muy limitado y éste tiene unas dimensiones predeterminadas, de manera que el PCB pueda caber en la ranura de la caja destinada a aplicaciones lab-on-a-chip previamente fabricada en la escuela. El área del metacrilato está limitada a $64 \times 64 \text{ mm}^2$. La sección del microcanal decidió hacerse de 1 mm^2 por simplicidad de los cálculos (1 microlitro equivale a un milímetro de longitud en el canal).

En segundo lugar, las zonas de distintas temperaturas deben estar lo suficientemente separadas

para que el calentador de un lado no afecte al otro. En tercer lugar, el volumen de la muestra debe ser de 25 microlitros, y el resto del canal se llenará con agua o cualquier otro líquido. Teniendo todas esas consideraciones en cuenta, en primera aproximación se optó por hacer un canal en forma de U, de manera que la muestra en la fase de denaturación se situase en un lado, y en la segunda fase en el otro. Para ello se utilizó L-Edit, un software CAD dedicado a la creación de layouts.

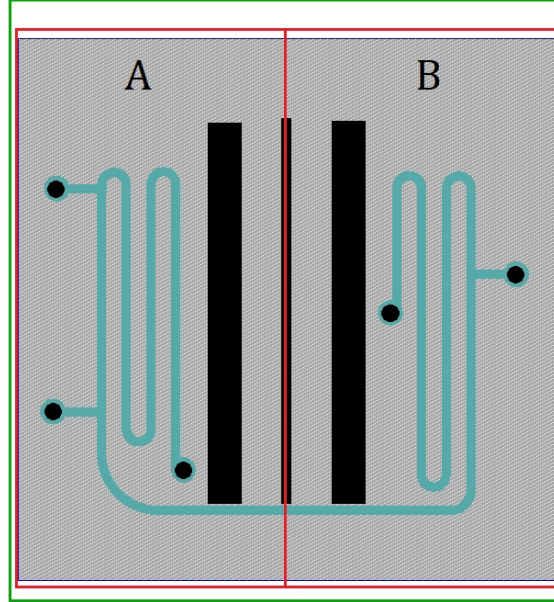


Figura 3.1 Diseño del microcanal.

La línea verde exterior representa los límites del PCB, y la zona gris punteada en blanco el área del metacrilato. Los puntos negros representan perforaciones no pasantes, y los rectángulos negros del centro son perforaciones pasantes, cuyo objetivo es el aislamiento térmico de las zonas A y B. La zona A marcada con un rectángulo rojo es la zona de denaturación, que se encontrará a 95°C, y la zona B la de recocido, la cual estará a 65°C.

3.2 Sensores y actuadores del sistema

Para el diseño del PCB que alberga tanto las pistas de calentamiento como las NTC que miden la temperatura existen dos posibles opciones: que las pistas y las NTC estuvieran en la misma cara, y que las pistas estuvieran en una cara y las NTC en otra. Se deshechó la idea de posicionar las NTC y las pistas en la misma cara debido a que el posicionamiento de la NTC es complicado, ya que debe estar lo más cerca posible de la muestra y ese espacio estará ocupado por las pistas de calentamiento.

Las NTC son un tipo de sensores de temperatura cuya resistencia disminuye con el aumento de la temperatura, de ahí su nombre “Negative Temperature Coefficient”. La curva Resistencia-Temperatura es de forma exponencial, y la caracterizan dos parámetros A y B. El fabricante proporciona el valor de B, que para una temperatura de entre 25 y 95°C es $B = 3435$, y A se despeja de manera trivial de la ecuación de la NTC:

$$R(T) = A \cdot (e)^{B/T},$$

siendo el valor de $A = 98.6176 \cdot 10^{-3}$.

Conocidos los parámetros A y B se pueden obtener los valores de las resistencias correspondientes a 25°C (temperatura ambiente), 65°C y 95°C siendo estas $R_{25} = 10000\Omega$ (valor dado también por el fabricante), $R_{65} = 2556\Omega$ y $R_{95} = 1116\Omega$. A continuación se muestra la curva R-T de la NTC que se eligió para este circuito en particular, con los tres valores de resistencia resaltados.

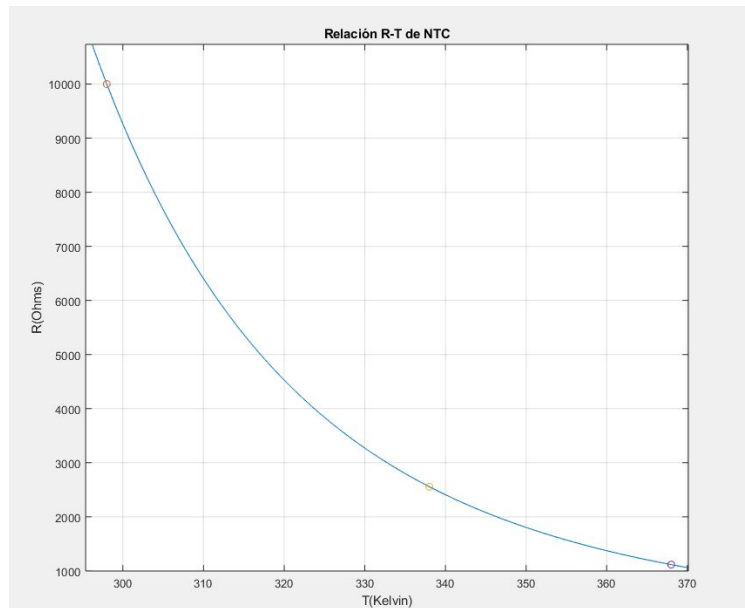


Figura 3.2 Curva de la NTC caracterizada.

Las NTC serán las responsables de medir la temperatura en el Lab-On-PCB. Para el diseño de las pistas de calentamiento, se optó por una configuración en serpentín, a un lado y a otro del PCB. A continuación se muestra el diseño final de las pistas de calentamiento sobre el diseño del microcanal. La primera figura representa la cara superior del PCB, y la segunda representa la cara inferior, vistas desde arriba (sin voltear el PCB para ver la cara de abajo). En ambos casos se representa el canal que se encuentra en la cara de arriba.

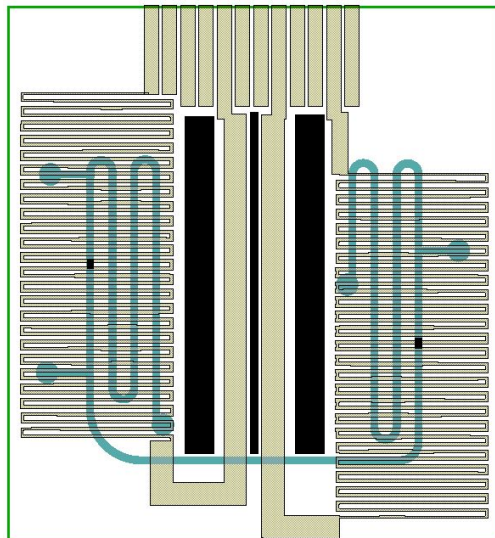


Figura 3.3 Pistas de calentamiento sobre microcanal. Cara superior.

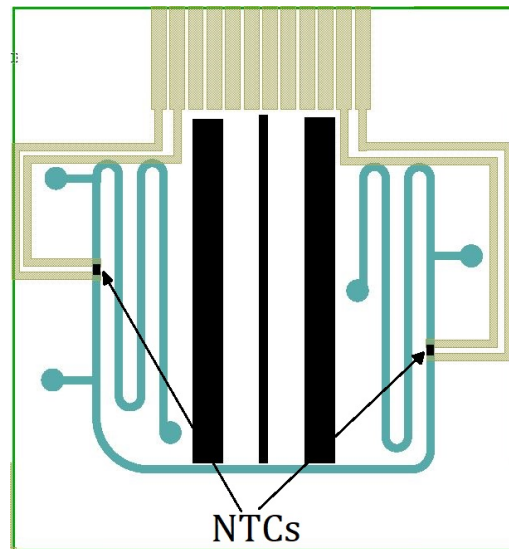


Figura 3.4 Pistas de las NTC sobre microcanal. Cara inferior.

Para evitar en la mayor medida posible la transmisión de calor entre ambas pistas de calentamiento, se decidió añadir huecos pasantes entre ambas pistas en el PCB (representados en negro).

Como se aprecia en la **Figura 3.3**, el calentamiento se producirá de forma más homogénea alrededor de las zonas de las NTC. Los huecos (representados como rectángulos negros) son no pasantes, con una dimensión de 1,1 mm de alto y 0.7 mm de ancho. El tamaño y distancia de los pads están también predeterminados para la compatibilidad con otros Lab-on-PCB. Para el posicionamiento de las NTC, al ser del tipo SMD, sólo habría que hacer una ranura con las dimensiones del componente y llevar pistas de cobre desde los dos extremos a otro par de pads. (**Ver Figura 3.4**)

El tamaño y distancia de los pads están también predeterminados para la compatibilidad con otros Lab-on-PCB.

Con estos tres elementos definidos se concluye el diseño del *Lab-on-PCB*.

4 Diseño del circuito electrónico de control de temperaturas

Para el diseño del circuito electrónico de control de temperaturas, se partió de este circuito, dibujado en MicroCap.

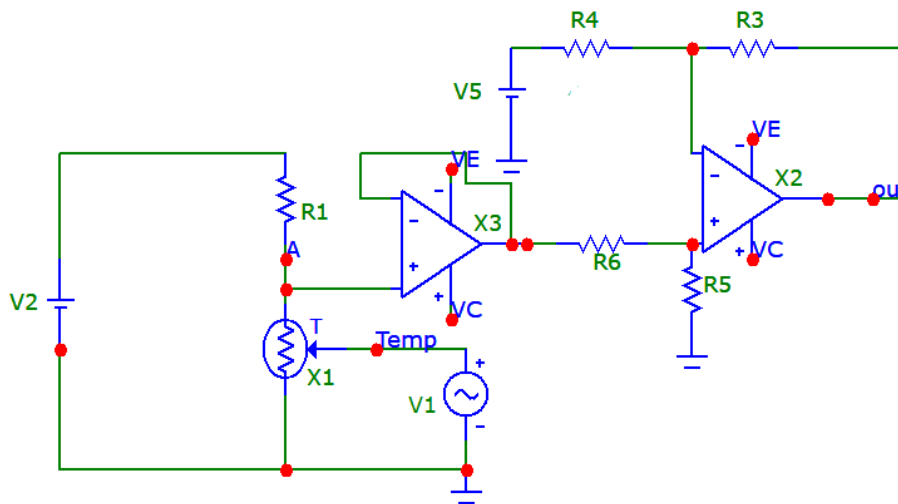


Figura 4.1 Circuito de control de temperaturas sin particularizar.

Por un lado, se trata de un divisor de resistivo alimentado por una tensión de referencia a 12V. En éste se encuentra una resistencia fija, conectada a alimentación y seguido de ella el punto A. Si varía la temperatura, la NTC cambia su valor de resistencia, cambiando así el valor en el punto A según la razón:

$$V_A(T) = \frac{R_{NTC}}{R_{NTC} + R_1} \cdot V_2 \quad (4.1)$$

Bajo el punto A se encuentra la NTC. Para simular el cambio de temperatura que se llevará

a cabo en el circuito real, se utilizó V1, una fuente de tensión sinusoidal con una Macro, en el cual el valor de corriente continua corresponde a la temperatura a la que se encuentre la NTC.

Teniendo ya una tensión variable V_A en función de la temperatura, es necesario convertir el rango de tensiones a uno que sea apto para la entrada del microcontrolador. Para ello se utilizará un amplificador operacional, pero antes se debe asegurar evitar las pérdidas de corriente en la mayor medida posible. Es por esto por lo que el punto A está conectado a un amplificador operacional en modo de seguidor de tensión. De esta manera, la influencia del circuito a la derecha del punto A está aislada del seguidor de tensión, asegurando así una relación fiel de la temperatura de la NTC y niveles de tensión asociados.

Por el otro lado se encuentra la parte del circuito de amplificación. La tensión del punto A seguida entra en el amplificador diferencial, en el cual la tensión será amplificada según la razón:

$$V_{out} = (R3/R4) \cdot (V_A - V_5) \quad (4.2)$$

Esta señal de salida entra directamente a uno de los pines de entrada del microcontrolador, uno por cada circuito. En este caso serán dos circuitos, ya que debemos controlar a 65°C y a 95°C simultáneamente. El objetivo del circuito de control de temperaturas es obtener una señal de la tensión asociada a la temperatura de la NTC, para, en función de ella, calentar dejando pasar corriente en los calentadores del Lab-on-PCB o enfriar sin dejar pasar corriente a través de los calentadores.

Para este circuito se utilizó tanto en la simulación como en la realidad el OpAmp LM358. Este amplificador operacional (doble) no es *rail-to-rail*, por lo que no llega a 0V, sino que satura en 0.8V. De modo que el rango de tensiones válido para el circuito será de 3.6V a 0.8V.

4.1 Particularización del circuito para 95°C

Para particularizar el circuito a 95°C basta con introducir el valor de la temperatura en la DC de la fuente de alterna V1. Se ha de introducir también la tolerancia de $\pm 1^\circ\text{C}$ en la amplitud. Rescatando los valores de resistencia asociados a 95°C y 65°C de la Figura 3.2, $R_{65} = 2556\Omega$ y $R_{95} = 1116\Omega$, podemos obtener el rango de tensiones V_A de cada circuito utilizando la Ecuación 4.1. Para 95°C, simulando la fluctuación de temperaturas esperada en el sistema, de 95°C a 97°C, se obtiene el rango de voltajes de V_A . Se muestra a continuación la curva del rango de tensiones y el rango de tensiones asociado a la resistencia R1 elegida.

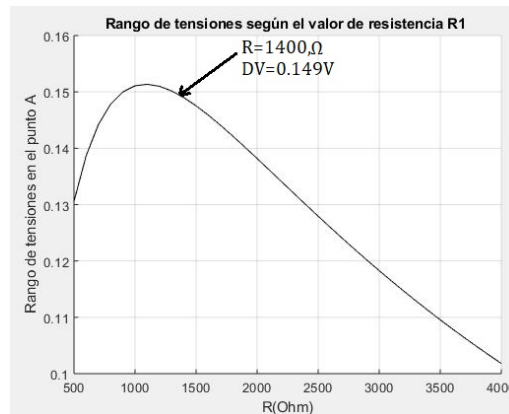


Figura 4.2 Curva del rango de tensiones para 95°C.

El objetivo ahora es convertir este rango de 0.15V en un rango viable con el circuito de amplificación. Para ello se utiliza la Ecuación 4. Lo primero es fijar V_{max} y V_{min} . Para evitar la saturación del

amplificador y tener una mayor holgura¹ se eligieron aproximadamente los valores $V_{max} = 2.8V$ y $V_{min} = 1.65V$. Sabiendo V_A , V_5 y que el circuito está alimentado a una $V_{cc} = 12V$, obtenemos la relación de resistencias $\frac{R_3}{R_4}$, y fijando una de ellas a un valor estándar (en este caso fue $R_4 = 330$) y se despeja el valor de la otra resistencia de la relación. Así se hizo y a continuación se muestran los valores en una primera aproximación, así como los resultados de la simulación.

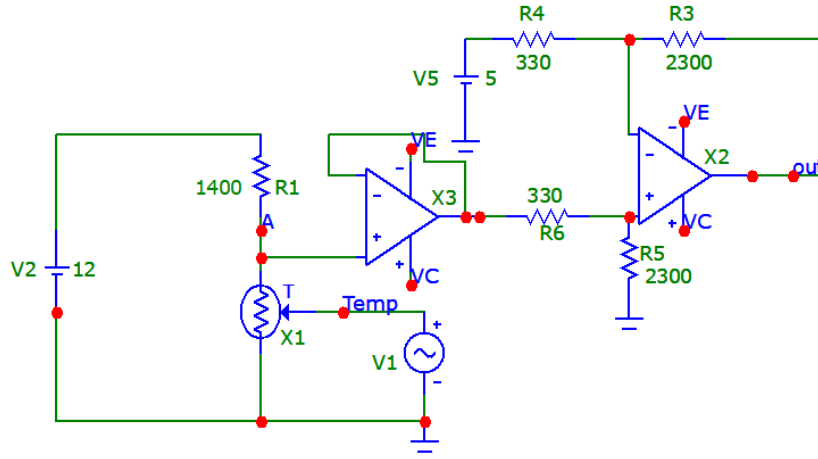


Figura 4.3 Circuito electrónico particularizado para 95°C.

Esta configuración produce los siguientes resultados para la simulación:

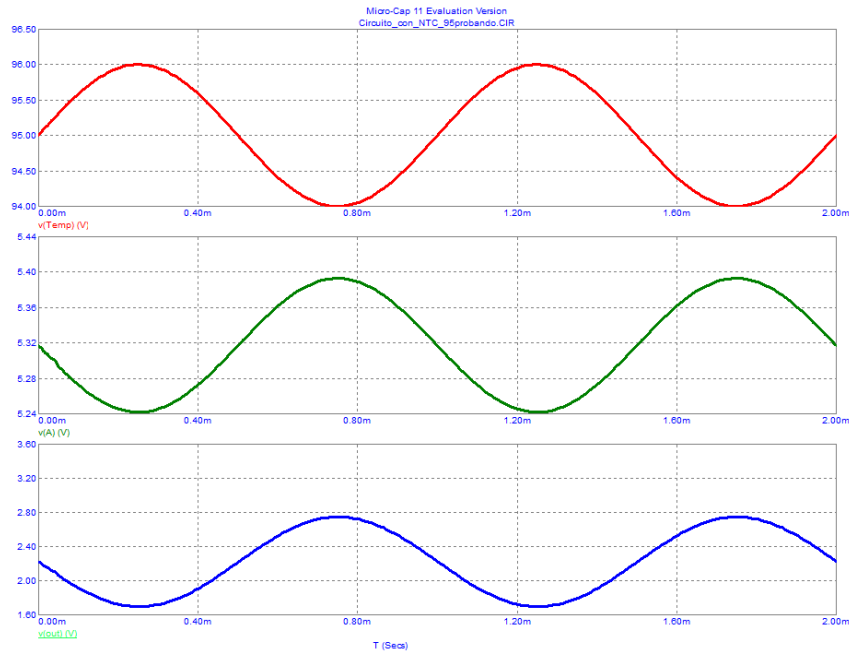


Figura 4.4 Resultados de la simulación para 95°C.

¹ Si hicieramos ese rango de 0.15V el máximo, es decir entre 0.8V y 3.5V, los valores de tensión fluctuarían mucho ya que equivalen a diferencias muy pequeñas de temperatura, y trataríamos de controlar un valor de temperatura muy concreto. Eliendo un rango más pequeño asociamos valores de tensión a diferencias de temperatura más grandes, siendo más fácil controlarlo, en caso de que se desvíe la temperatura por debajo de 95 o por encima de 97.

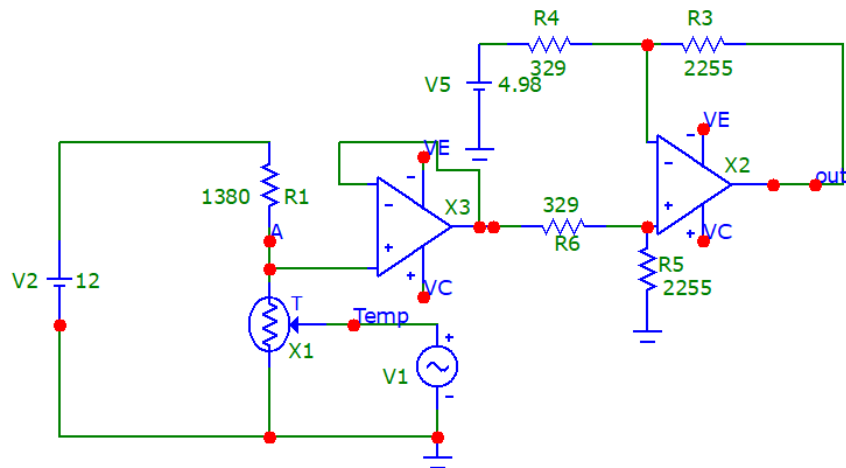
Tabla 4.1 Voltajes en el punto A y a la salida según temperatura.

Temperatura	V_A	V_{out}
96°C	5.2V	1.65V
94°C	5.37V	2.756V

Esta es una buena primera aproximación ya que se encuentra dentro del rango de voltajes de no saturación (0.8, 3.5)V y hay valores de sobra de la tensión para poder controlarla a la salida.

Un dato a tener en cuenta es que **altos valores de temperatura se traducen en bajos valores de tensión**. Es decir, la tensión a la salida es inversamente proporcional a la temperatura de la NTC.

Tras la fabricación de la placa y con el objetivo de controlar mediante simulación el comportamiento del sistema, se decidió afinar los valores de las resistencias del circuito teniendo en cuenta la tolerancia de las mismas. Para ello, con ayuda una placa de pruebas se introdujo una resistencia de valor $R_{95} = 1100\Omega$ en la bornera de la NTC, de manera que se tuviese una tensión constante a la salida; la correspondiente a 95°C. También se midieron valores de tensiones e intensidades en distintos puntos del circuito para acercarlo lo máximo posible los resultados de la simulación al mundo real. Estos son los valores finales de las resistencias, así como los resultados finales de la simulación.

**Figura 4.5** Valores finales del circuito de 95°C.

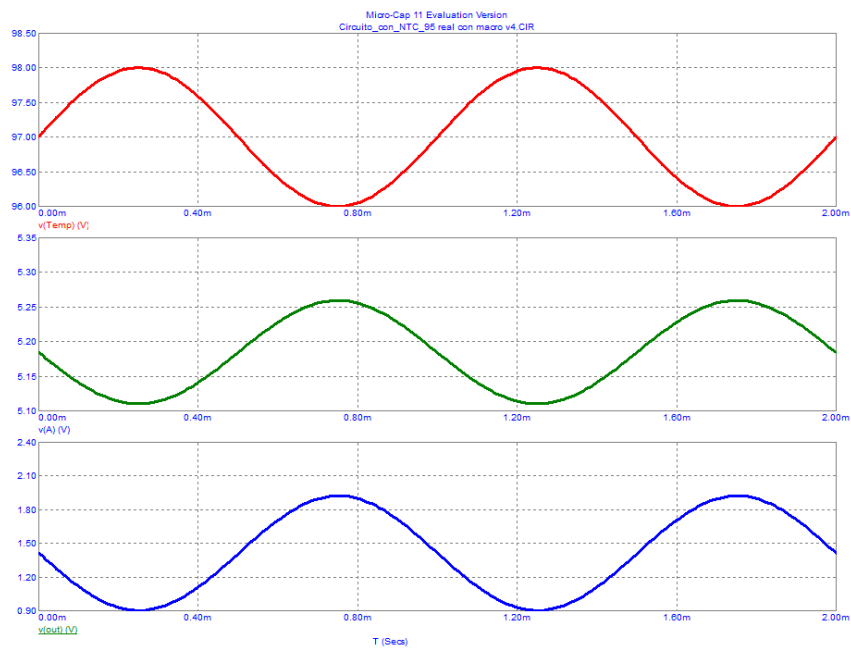


Figura 4.6 Resultados finales de la simulación a 95°C.

Tabla 4.2 Voltajes en el punto A y a la salida según temperatura (ajustados).

Temperatura	V_{out}
98°C	0.9V
96°C	1.921V

4.2 Particularización del circuito para 65°C

Para el circuito de 65°C se siguió el mismo procedimiento: primero introducir el valor de la temperatura deseada en el valor de tensión de DC en V1, con una tolerancia de +-1°C, y posteriormente colocar los valores de las resistencias para obtener una salida de entre 0,8 y 3,5V. La curva de rango de tensiones según R1 se muestra a continuación.

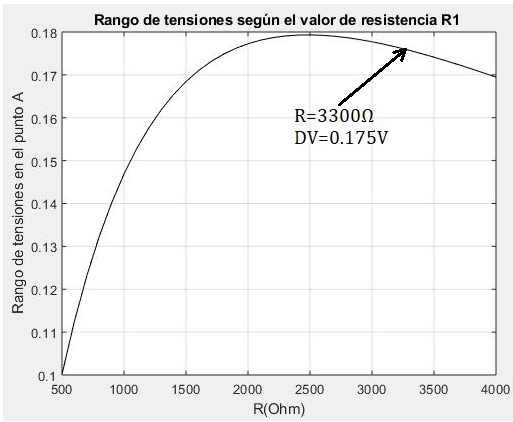


Figura 4.7 Curva del rango de tensiones para 65°C.

De igual manera que en el circuito de 95°C, conocidos V_A , V_5 y V_{cc} , se fijaron unos valores de V_{out}

en la Ecuación 4 (del mismo orden que el de 95°, pero con valores distintos para poder diferenciar las señales fácilmente), en este caso en particular $V_{min} = 1.2V$ y $V_{max} = 2.6V$. Se obtuvo entonces la relación de resistencias, y en este caso se fijó una resistencia estándar $R3 = 3900\Omega$, y se obtuvo $R4 = 500\Omega$. A continuación se deja el circuito con los valores finales y su simulación.

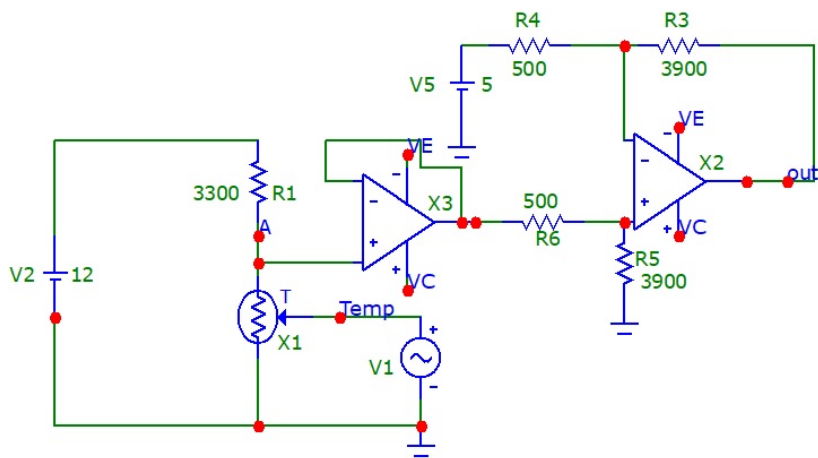


Figura 4.8 Circuito electrónico particularizado a 65°C.

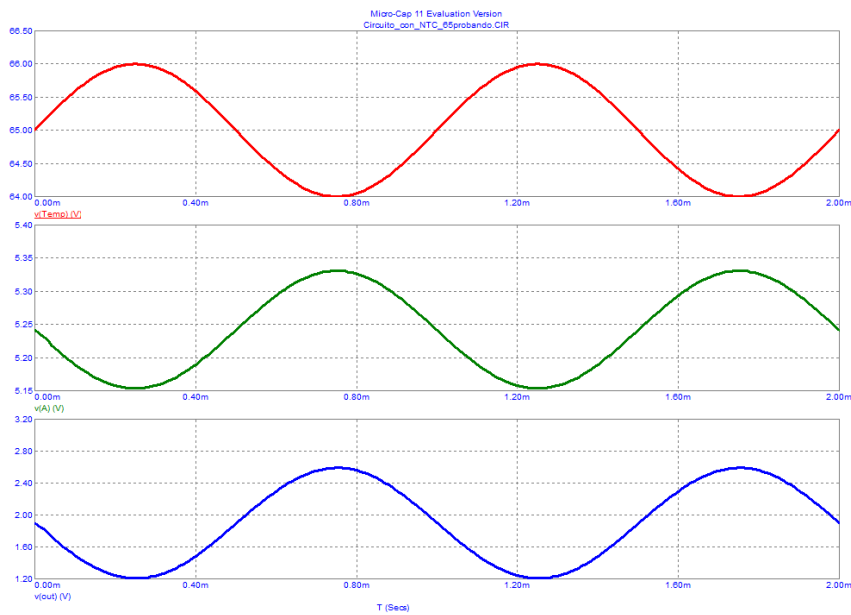


Figura 4.9 Resultados de la simulación para 65°C.

Tabla 4.3 Voltajes en el punto A y a la salida según temperatura.

Temperatura	V_A	V_{out}
66°C	5.15V	1.2V
64°C	5.33V	2.59V

De nuevo, puede considerarse una buena solución ya que se encuentra en el rango de no-saturación del OpAmp.

Tras la fabricación de la placa, se siguió el mismo procedimiento para ajustar los valores de las resistencias en la simulación y el proyecto real. Introduciendo un valor de resistencia de $R_{65}=2500\Omega$ con ayuda de una placa de pruebas en la bornera de la NTC correspondiente, se ajustaron los valores a los representados a continuación, así como los resultados de la simulación definitivos.

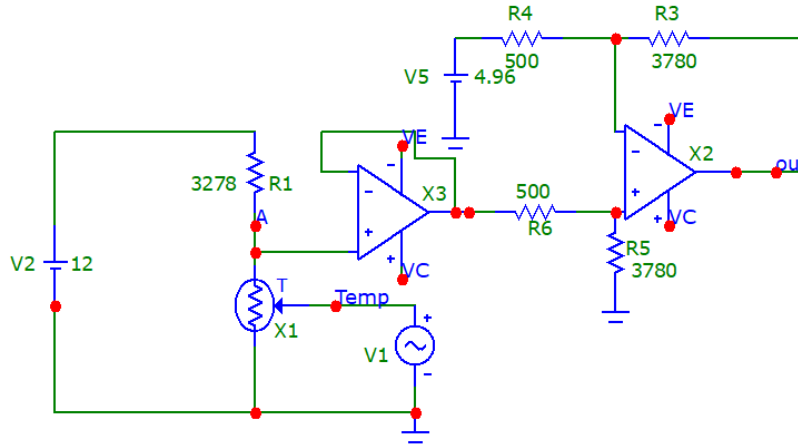


Figura 4.10 Valores finales del circuito de 65°C.

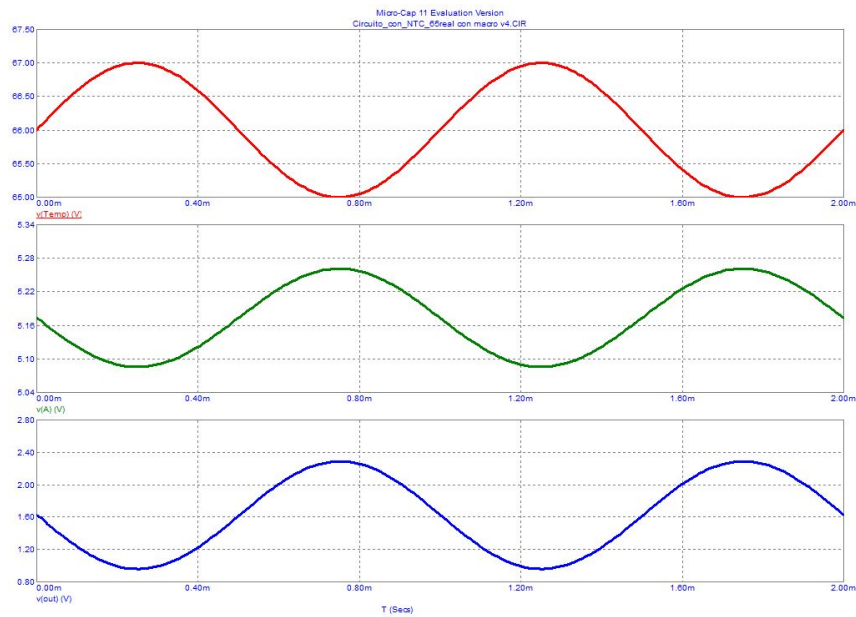


Figura 4.11 Resultados de la simulación finales para 65°C.

Tabla 4.4 Voltajes en el punto A y a la salida según temperatura (ajustados).

Temperatura	V_{out}
67°C	0.9V
65°C	2.288V

4.3 Circuito de protección

Durante las pruebas de la placa una vez fabricada, se notaron una serie de anomalías en el microprocesador: a los pocos segundos de estar funcionando, pasaba a dejar de funcionar parcial o totalmente; dejaba de controlar uno de los circuitos o ambos. Tras una breve investigación en el datasheet, se dio con el problema. Resulta que cuando la NTC está a temperatura ambiente, está en torno a los $10k\Omega$. Para calentar la NTC de 25°C a cualquiera de las temperaturas deseadas es necesario uno o dos minutos de calentamiento. Si se simula el circuito con una resistencia fija de $10k$ en vez de la NTC:

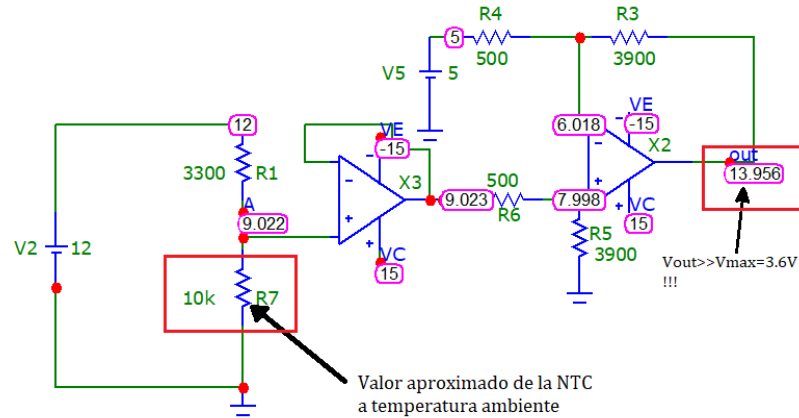


Figura 4.12 Simulación del circuito con $R_{NTC}=10k\Omega$.

se obtiene a la salida una tensión $V_{out}=13.956\text{V}$, **muy por encima de la tensión máxima admitida en cualquiera de los pines, $V_{max}=3.6\text{V}$** . Esta tensión además va decreciendo poco a poco hasta llegar a una de las temperaturas deseadas, pero el microcontrolador está sometido a una tensión de entrada muy superior a la V_{max} durante un tiempo considerable. Se procedió entonces a diseñar un circuito de protección, y esta fue la solución con la que se eliminó el problema.

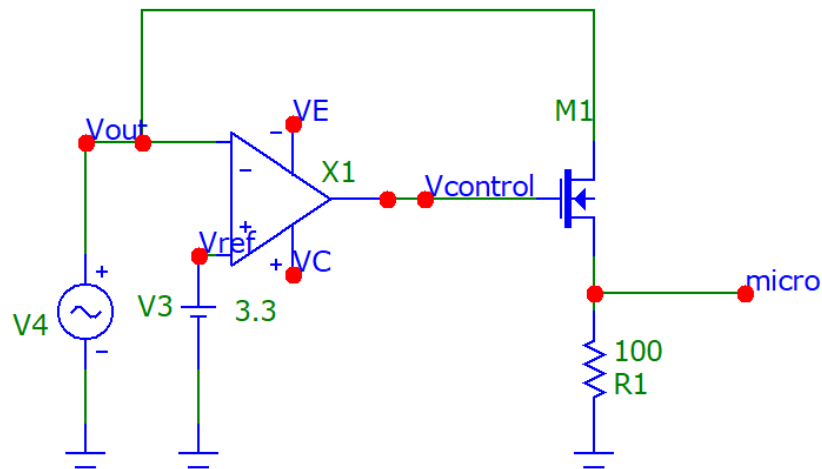


Figura 4.13 Circuito de protección del microcontrolador.

V4 representa la salida de los operacionales, la cual supera los 10V en el periodo de tiempo de calentamiento de 25°C a más de 60°C. La señal entra en un comparador, de forma que si es mayor a $V_{ref}=3.3V$, la salida del comparador se va a $-V_{cc}$ (0V en este caso), y si es menor que 3.3V satura a $V_{cc}=12V$. La salida del comparador ($V_{control}$) va a la puerta de un MOSFET (con $V_t=4V$) que se cierra ($V_{gs}=12V$) si $V_{out}<3.3V$ y se corta ($V_{gs}=0V$) si $V_{out}>3.3V$. A continuación se muestran las curvas de la simulación del circuito.

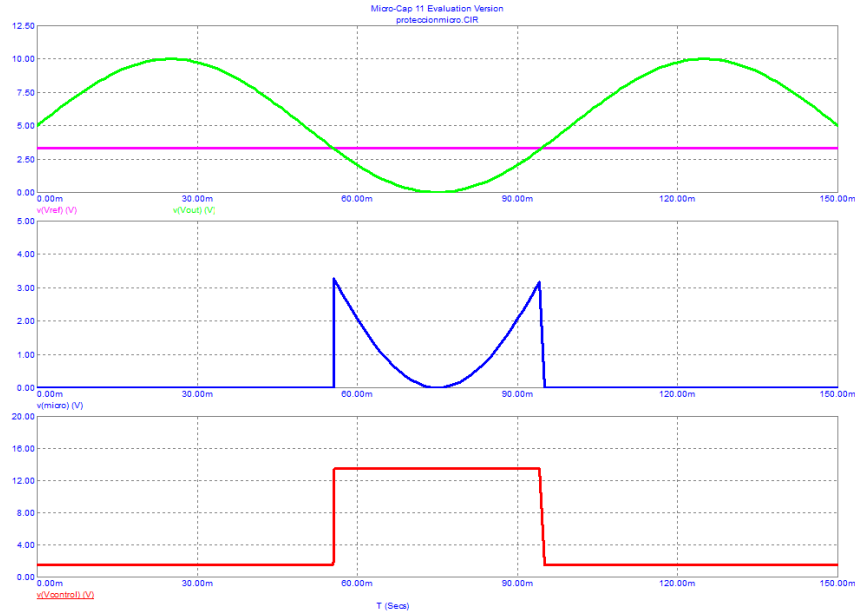


Figura 4.14 Simulación del circuito de protección.

La curva verde es la señal original de salida de los operacionales V_{out} , que va de 10 a 0V. Con $V_{ref}=3.3V$, se aprecia cómo V_{micro} , cuando $V_{out}>V_{ref}$, se va a cero, sólo dejando pasar los valores de tensión de 0 a 3.3V. Esto podría suponer un problema a la hora de programar el microcontrolador, ya que no diferencia de si la salida es realmente cero o si V_{out} se encuentra por encima de V_{ref} . Sin embargo, en la práctica, la salida de los operacionales nunca llega a cero ya que el LM358 satura a $V_{out} = 0.8V$, de modo que si $V_{out} = 0V$ se entiende que aún no ha llegado al rango de temperaturas y el microcontrolador enviará la señal para que caliente.

4.4 Pruebas del circuito de amplificación en placa de pruebas

Antes de pasar a la fabricación de la placa, se hicieron una serie de pruebas para asegurar el correcto funcionamiento del circuito, y para asegurar que las simulaciones se asemejaban a los resultados reales.

Tabla 4.5 Comparación de voltajes (65°C) de simulación y placa de pruebas.

	V_{max}	V_{min}
Simulación	2.288V	0.9V
Placa de pruebas	2.5V	1.2V
Diferencia	0.3V	0.3V
Diferencia en °C	0.6°C	0.6°C

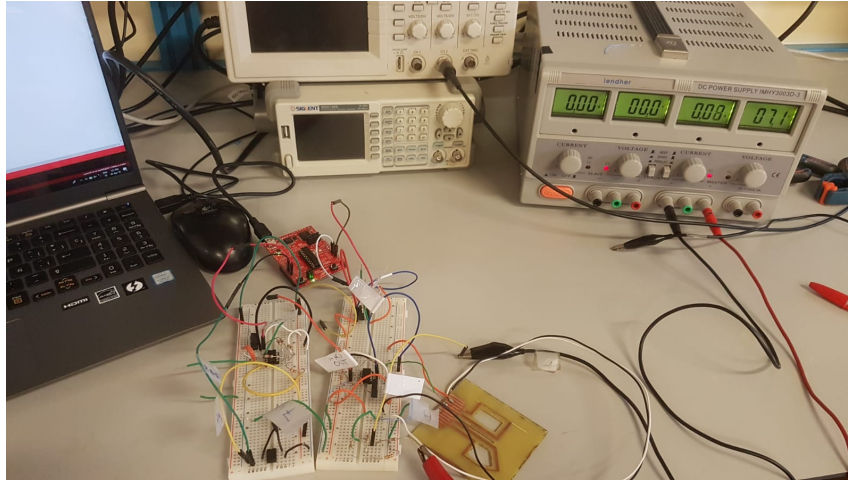


Figura 4.15 Pruebas de los circuitos de amplificación.

Tabla 4.6 Comparación de voltajes (95°C) de simulación y placa de pruebas.

	V_{max}	V_{min}
Simulación	2.6V	1.5V
Placa de pruebas	2.4V	1.2V
Diferencia	0.2V	0.3V
Diferencia en °C	0.4°C	0.4°C

En vista a la poca variación de tensión de la simulación a la placa de pruebas, se validó esta configuración y se dio paso al diseño del PCB de control de temperatura.

5 Definición y diseño del PCB de control de temperatura

Tras las pruebas de los distintos subsistemas, se pasó al diseño del PCB central. A continuación se deja un diagrama de bloques del sistema simplificado con los cuatro subsistemas físicamente diferenciados y de sus interacciones.

5.1 PCB de control de temperatura

Una vez probado el circuito electrónico de amplificación, se pasó a su diseño para ser impreso en PCB. Para ello se utilizó el software CAD de diseño de PCB llamado KiCad. Para desglosar el funcionamiento de la placa, se deja a continuación un diagrama de bloques con los distintos circuitos que componen el PCB.

Las medidas de las NTCs del Lab-on-PCB entran en los divisores de tensión de cada circuito de amplificación. La tensión de salida de cada circuito entra en el circuito de protección, que anula toda tensión superior a 3.3V. Esta señal acondicionada entra directamente al micro, en el pin P1.3 y P1.4 respectivamente. Dependiendo de este nivel de tensión entrante en el micro, éste proporciona un PWM al driver de los MOSFETS con más o menos duty cycle. Una señal a más tiempo en 1 significa un paso mayor de corriente por las pistas, y con ello un aumento de temperatura mayor.

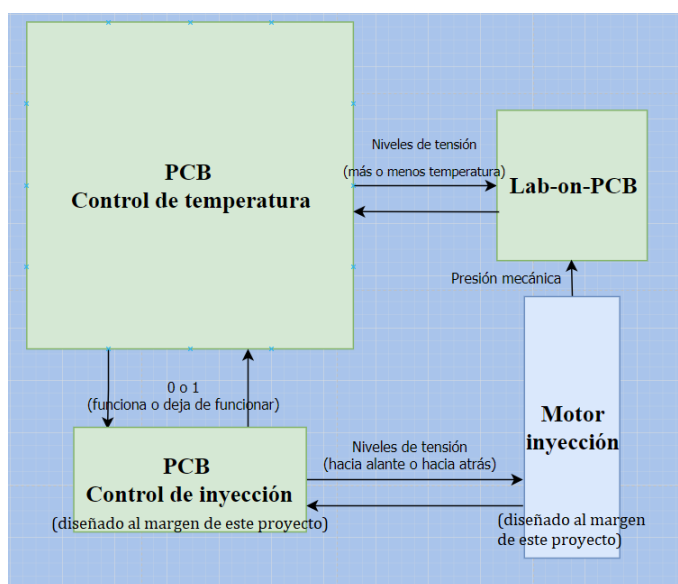


Figura 5.1 Esquema general del sistema completo.

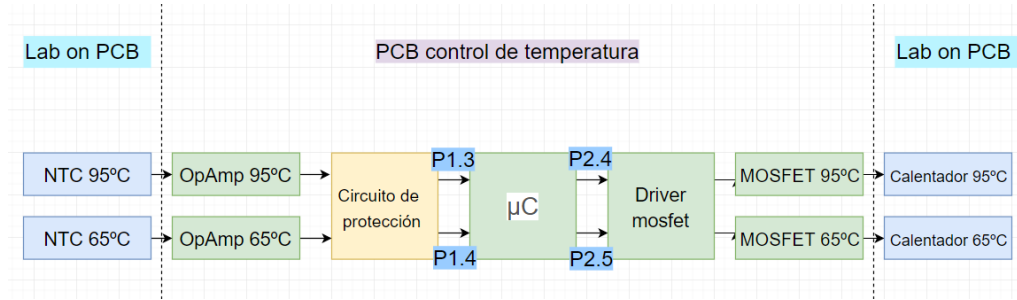


Figura 5.2 Diagrama de bloques del funcionamiento de la placa central.

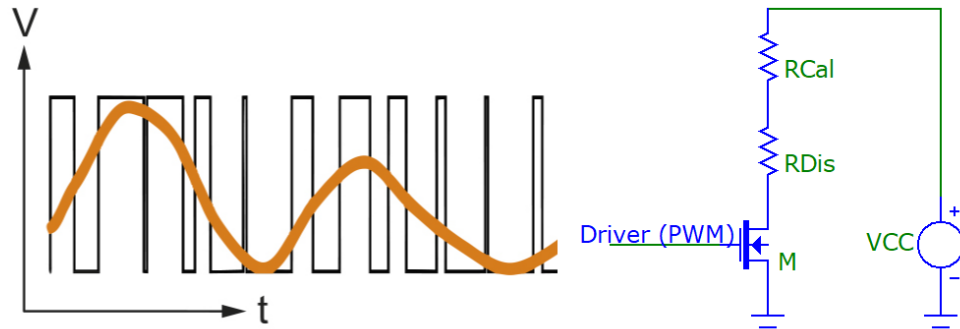


Figura 5.3 Circuito de calentamiento.

‘RCal’ representa el serpentín del calentador en el Lab-on-PCB, ‘RDis’ representa la resistencia de disipación de calor situada en el PCB de control de temperatura. El PWM del micro pasa al driver, y de ahí a los MOSFETs. Cuando la señal de tensión es alta, el MOSFET cierra el circuito y permite el paso de corriente de VCC a tierra, cuando es baja, el MOSFET se corta y no permite el paso de corriente. Las siguientes figuras muestran el esquema del circuito de calentamiento para cada temperatura.

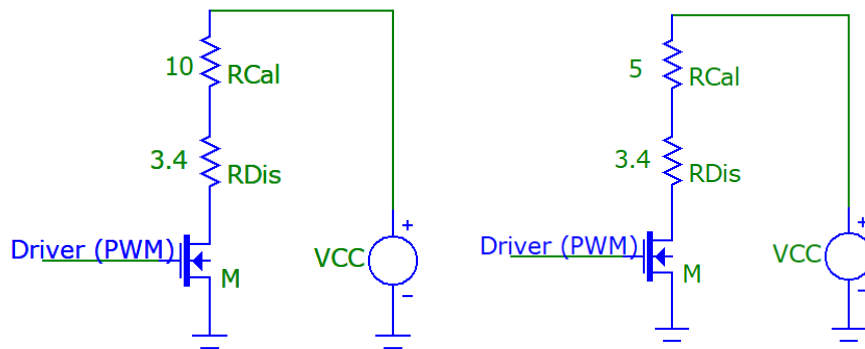


Figura 5.4 Esquemático del circuito de calentamiento para 65°C y 95°C respectivamente.

Se decidió disminuir la resistencia de disipación en el circuito de 95°C a 5Ω para permitir mayor paso de corriente, ya que en las pruebas de calentamiento no llegaba a alcanzar la temperatura. Usando la ley de Ohm podemos **calcular la intensidad máxima que puede alcanzar el circuito:** $I_{max,65} = \frac{12}{13.5} = 0.88A$ y $I_{max,95} = \frac{12}{8.5} = 1.41A$. Sin embargo, al estar los MOSFET bajo control mediante un PWM, el cual para este proyecto se limita al 90%, nunca alcanzará dichos valores. A continuación se deja el diseño final del esquemático, diferenciando las distintas partes que lo componen.

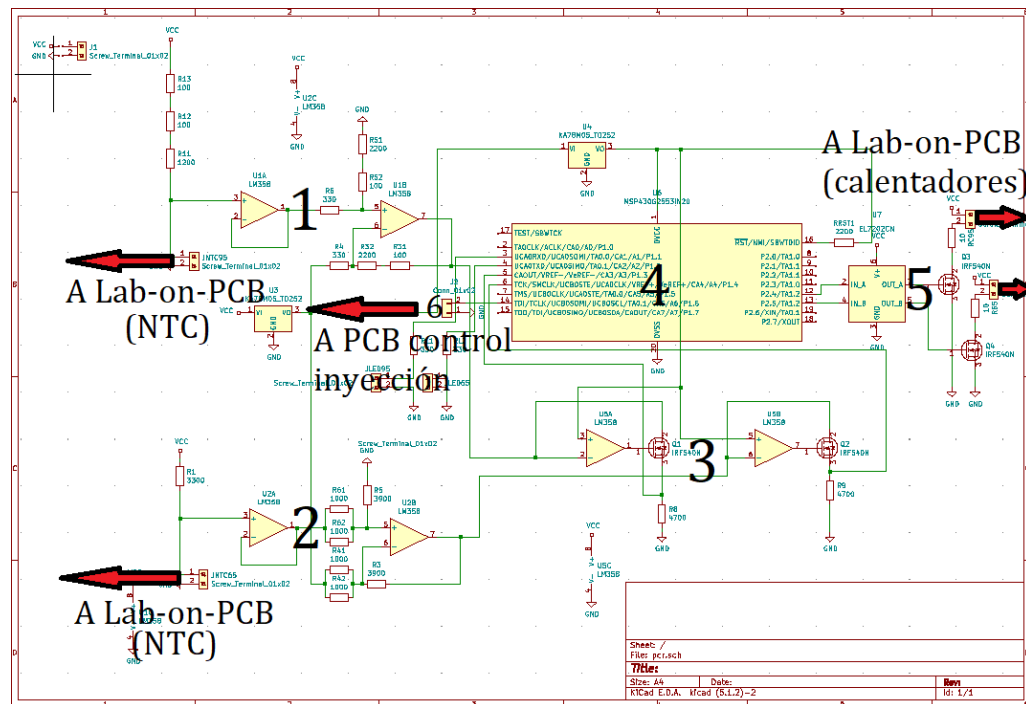


Figura 5.5 Esquemático del PCB de control de temperatura.

1. Circuito de amplificación de 95°C (Conectado con una NTC del Lab-on-PCB)
2. Circuito de amplificación de 65°C (Conectado con la otra NTC del Lab-on-PCB)
3. Circuito de protección
4. Microcontrolador (MSP430G2553)
5. Circuito de calentamiento (Conectado con las pistas de calentamiento del Lab-on-PCB)
6. Conector del PCB de control de inyección

Tras la definición del esquemático, se pasó al diseño del PCB. Debido al elevado número de componentes, se optó por trabajar con un área de 90x90mm de PCB a doble cara. A continuación se muestra el diseño final del PCB utilizando el mismo software, marcados con los mismos números los diferentes circuitos.

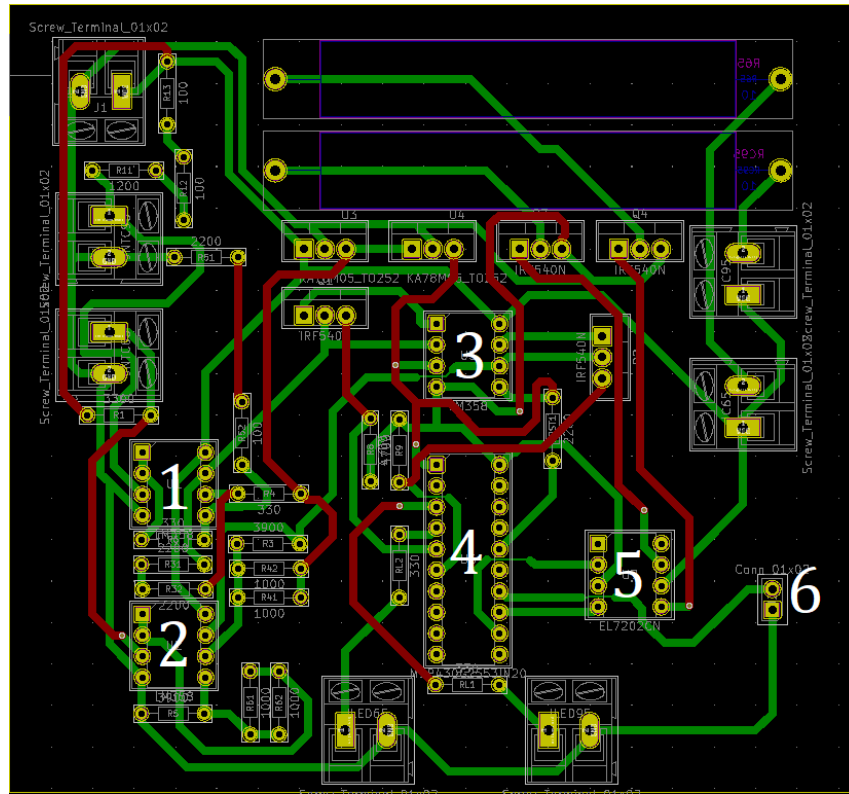


Figura 5.6 PCB de control de temperatura en 2D.

Las pistas en rojo representan la capa de arriba (donde se soldarán todos los componentes) y las pistas en verde representan la capa de abajo. Nótese que la mayoría de las conexiones con los circuitos integrados están en verde. Esto es para asegurar una soldadura mucho más fácil y rápida. En las partes que no era posible acceder a los pines con las pistas verdes, se recurrió a poner vías (conexiones que van desde la capa de arriba del PCB a la capa de abajo).

Los integrados 1 y 2 son los amplificadores operacionales (LM358) de los circuitos de 65°C y 95°C. El integrado 3 es otro amplificador operacional doble, utilizado por el circuito de protección (uno por cada circuito). Sobre él, se encuentran alineados cuatro componentes: empezando desde la izquierda se tiene un regulador de tensión de 5V (L7805ABV), encargado de bajar la tensión de $V_{CC} = 12V$ a 5V. A su derecha, se encuentra el regulador de 3,3V (UA78M33CKCS), el cual alimenta al micro (MSP430G2553, marcado en 4) y está conectado al positivo de los operacionales de protección, siendo ésta la tensión a la que compara para que no sobrepase la tensión máxima admitida del micro $V_{max} = 3.6V$. Se decidió colocar los dos reguladores de tensión lo más cerca de VCC posible dada la simplicidad a la hora de realizar el ruteo del PCB. A su derecha se encuentran los dos MOSFET (IRF640N) encargados de aplicar corriente al circuito de calentamiento. Los otros dos componentes que se encuentran uno a la derecha y otro a la izquierda del OpAmp marcado como 3, son los MOSFET del circuito de protección. Por último, el integrado marcado como 5 es un driver de dos canales (TC4427) encargado de administrar la corriente que llega a la puerta de los MOSFET del circuito de calentamiento.

Las resistencias grandes de la esquina superior derecha son las responsables de la disipación del calor en el circuito de calentamiento. Posteriormente en la prueba de la placa se decidió soldarle una en paralelo a la resistencia correspondiente del calentamiento de 95°C, debido a que una resistencia tan grande (10 Ohm) impedía que la intensidad suficiente para llevar las pistas a 95°C pasara por el circuito. La corriente máxima admitida de los reguladores de 5 y 3.3V son $I_{max} = 500mA$ según sus respectivos datasheets. Esta corriente I_{max} está muy por encima de la corriente que circula por el circuito, dado que el regulador de 5V alimenta a tres operacionales, y

la corriente que circula por ellos nunca es superior a $5mA$. El regulador de $3.3V$ sólo alimenta al micro, por lo que el valor de intensidad, bajo funcionamiento normal del circuito, nunca alcanzará los $500mA$.

El software KiCad permite una visión en 3D del pcb que se esté diseñando, lo cual permite hacerse a la idea de cómo va a quedar el circuito que esté diseñando. A continuación se muestran una vista superior y otra inferior del modelo 3D del PCB de control de temperatura.

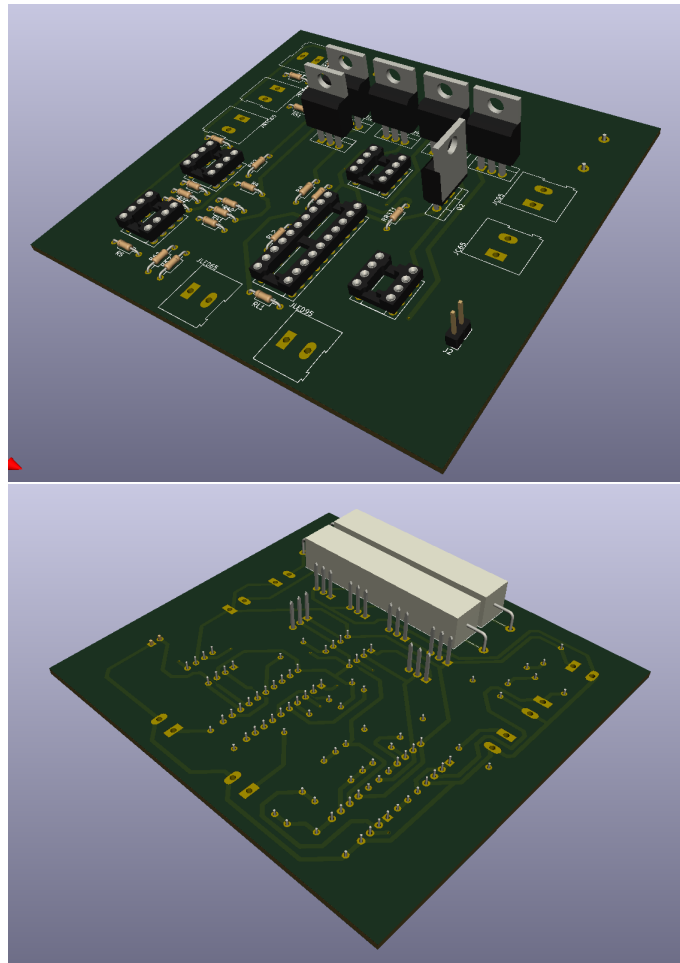


Figura 5.7 Vista superior e inferior del PCB en 3d.

Se decidió poner las resistencias grandes en la parte de abajo del PCB para evitar que transmitiesen calor a los reguladores de tensión y a los MOSFET.

A continuación se deja una lista de los componentes electrónicos necesarios para la fabricación del circuito.

Tabla 5.1 Lista de componentes electrónicos con su precio unitario y total.

Lista de precios de los componentes			
Componente	Unidades	Precio unitario	Precio total
LM358 (Amplificador operacional)	3	0.50€	1.5€
L7805ABV (Regulador 5V)	1	0.56€	0.56€
UA78M33CKCS (Regulador 3.3V)	1	0.74€	0.74€
MSP430G2553 (Microcontrolador)	1	1.58€	1.58€
IRF640N (MOSFET)	4	0.56€	2.24€
TC4427 (MOSFET Driver)	1	0.26€	0.26€
Resistencias	20	0.02€ (Aprox)	0.4€ (Aprox)
Resistencias de potencia	3	1€	3€ (Aprox)
Borneras (5mm paso)	7	0.13€	0.91€
LEDs (5mm)	2	0.10€	0.20€
Total	-	-	11.39€ (Aprox)

Aparte de los componentes electrónicos, habría que sumarle el precio de una placa de cobre de doble cara. El precio de una placa de 100x160x1.6mm es de alrededor de 5€.

5.2 PCB control de inyección y sistema de inyección

Estos dos subsistemas fueron diseñados por el departamento de microsistemas paralelamente al proyecto pero al margen de él. El PCB tiene su propio microcontrolador, que se conecta al PCB de control de temperatura por un par de pines; uno para conectar ambos micros mediante una señal digital (el de control de inyección le dice al de control de temperatura cuándo funcionar y cuándo no), y otro para compartir tierras. El sistema de inyección consiste en una estructura fabricada por impresión 3D en los laboratorios de la escuela para acomodar una jeringa, cuyo émbolo es movido por un motor. El microcontrolador del PCB del sistema de inyección controla el movimiento del fluido una vez se considere que haya pasado el tiempo requerido de denaturación y recocado.

6 Fabricación del sistema

Este capítulo se centra en los procedimientos llevados a cabo para la fabricación de los PCBs central y del Lab-on-PCB. A lo largo del proyecto se fabricaron dos placas de control de temperatura y tres Lab-on-PCB, debido a fallos en el diseño y en la fabricación misma.

6.1 Método de fabricación de circuitos impresos

La fabricación de circuitos impresos se lleva a cabo mediante varios pasos bien definidos. Existen diferentes técnicas para este proceso, a continuación se describe la técnica seguida en este proyecto:

- * **1er paso: Elaboración de las máscaras.** La máscara transfiere el diseño salido del software CAD de diseño al PCB a fabricar, mediante la técnica de photoplotter. Para exportar e imprimir el diseño en PDF existe un método para cada programa. En este proyecto, para el Lab-on-PCB se usó L-Edit, y para el PCB de control de temperatura se utilizó KiCad.

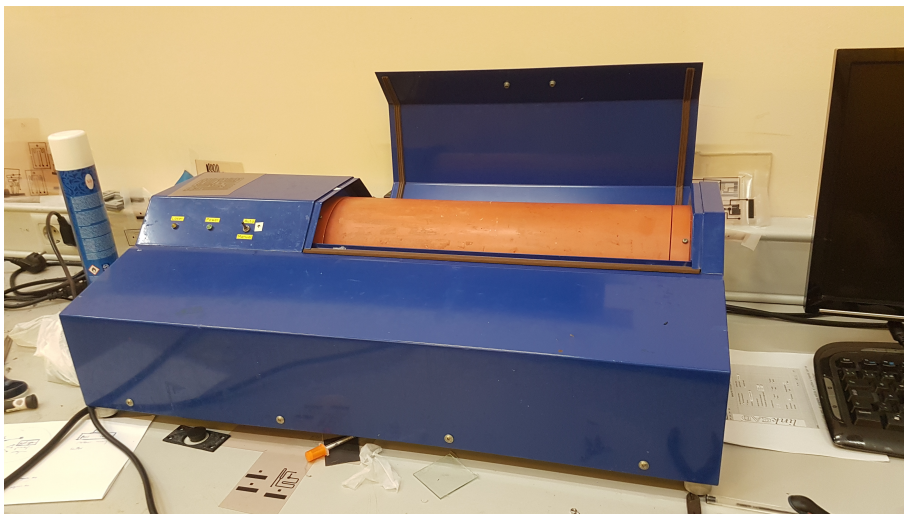


Figura 6.1 Photoplotter.

El procedimiento a seguir en L-Edit es el siguiente:

1. Una vez finalizado el diseño, esconder las capas que no se corresponden con las pistas de cobre y configurar las medidas en milímetros.
2. Navegar hasta File-> Export Mask Data -> (En el apartado de Export file type) GDSII -> Export
3. En LinkCAD, pasar el archivo anterior a la extensión .gbr.
4. Una vez en Convert Gerber into bitmap, se clicla en Import y se busca el archivo que se acaba de exportar. Una vez abierto, en mapa, se ajusta el diseño a la esquina superior izquierda. Tras ello, cliclar en Export.
5. En Run Photo USB, elegir la resolución máxima y tras colocar el fotolito correspondiente a oscuras en el photoplotter, cliclar en Plot.

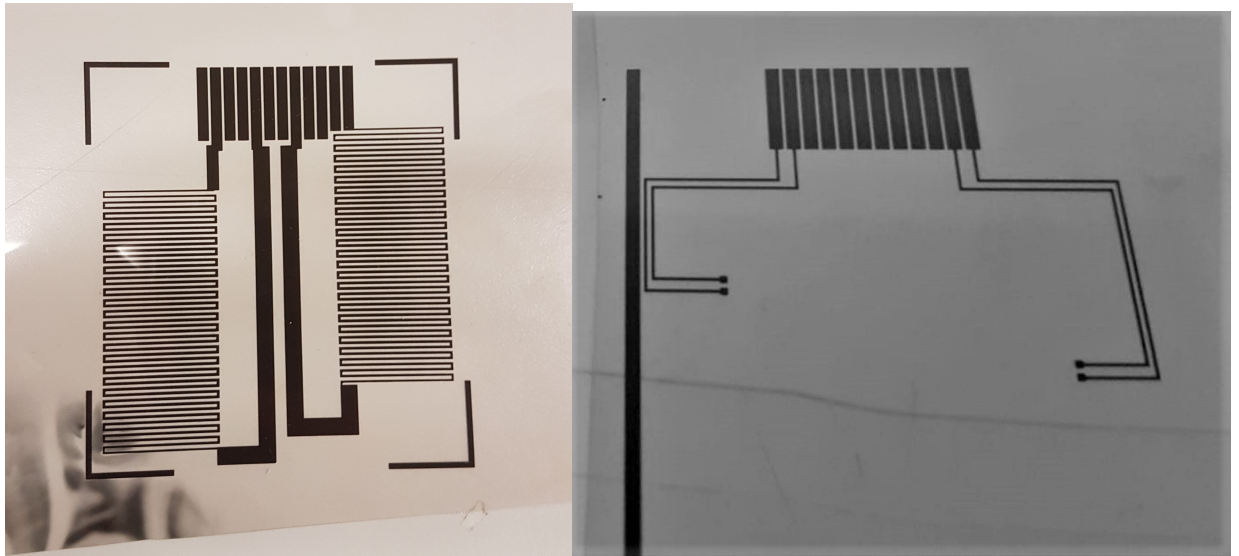


Figura 6.2 Fotolitos de las pistas de calentamiento y de las NTC.

Tras unos 45 minutos, se recogieron los fotolitos. Posteriormente hay que revelarlos, y tras ello se recogieron. (Ver Figura 7.2)

Antes de pasar al procedimiento para exportar el archivo a PDF en KiCad, se explicará como añadir al diseño zonas rellenas: estas añaden al diseño grandes masas de cobre conectadas a VCC o a tierra, lo cual es conveniente para el circuito, además de que con las zonas rellenas no se elimina tanto cobre del PCB, haciendo falta menos ácido y asegurando un revelado más limpio y fiable.

Para añadir zonas rellenas al diseño, en la barra de herramientas vertical de KiCad, seleccionar el icono de *Add Filled Zones*.

Al cliclar en la pantalla tras la selección de *Add Filled Zones*, saltará una ventana llamada *Copper Zone properties*, donde se puede elegir a qué estará conectado la zona, si a VCC, GND, o cualquier otra Net. Tras ello, se ha de marcar con un polígono cerrado la zona a rellenar. Una vez cerrado el polígono, Si se ha realizado el procedimiento correctamente, deberá aparecer el diseño con las zonas rellenas, como se muestra en la figura a continuación.

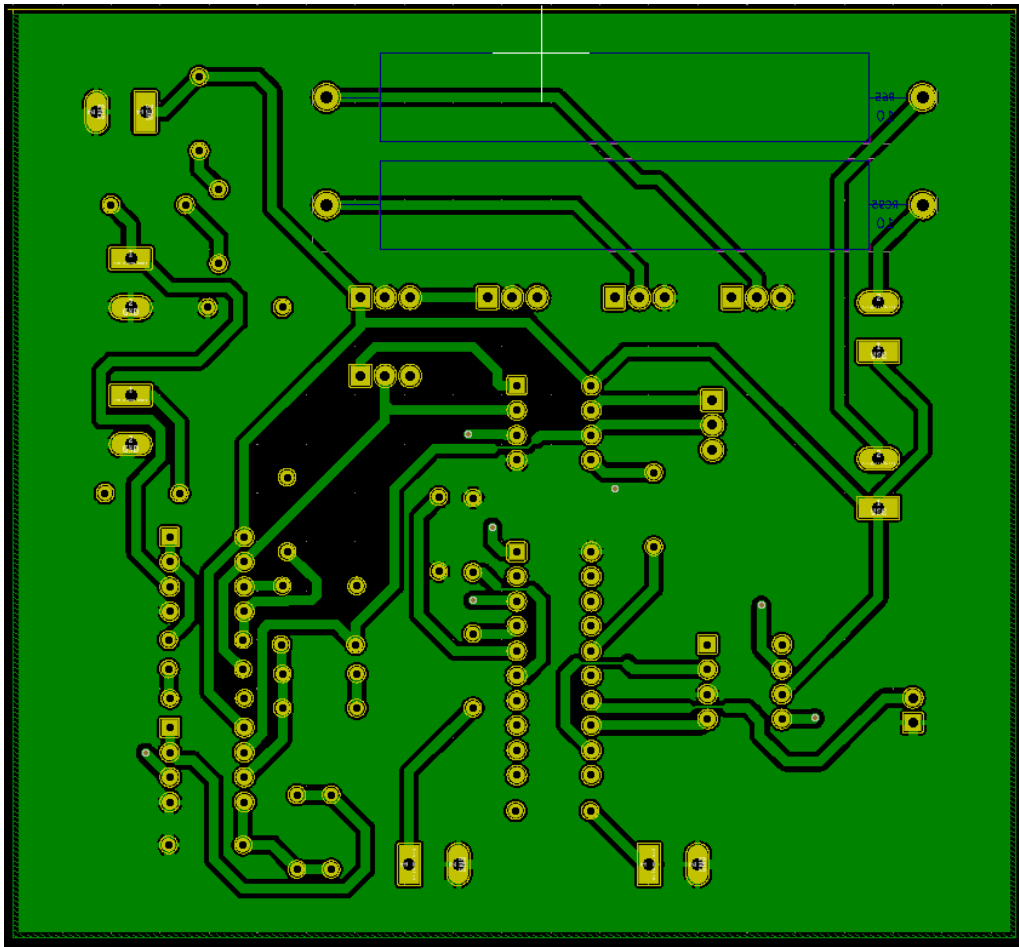


Figura 6.3 Circuito con zonas rellenas.

A continuación se detalla el procedimiento a seguir para exportar el diseño de las máscaras a PDF.

1. En la barra de herramientas horizontal, clicar en el icono de Print Board
2. Seleccionar una de las capas de cobre si se trata de un PCB multilayer
3. Seleccionar en el apartado de Output Mode el modo blanco y negro (Black and White)
4. En el apartado de Pagination, seleccionar la opción de One page per layer
5. En la sección de escala, seleccionar 1:1.
6. Antes de exportar, clicar en Print Preview para comprobar que el archivo a imprimir es correcto. Debería salir algo como la Figura 6.4.

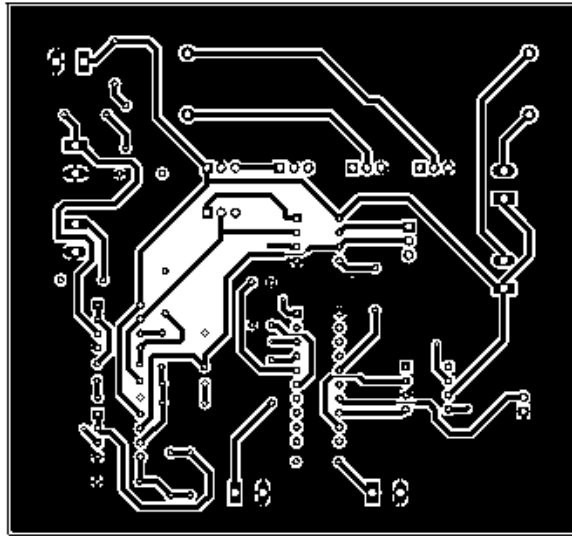


Figura 6.4 Print preview.

7. Si todo es correcto, cerrar el preview y clicar en Print.

La impresión debe realizarse en papel translúcido, de manera que deje pasar la radiación ultravioleta excepto por donde está impreso. Para este circuito no hace falta un photoplotter sino que es suficiente con una impresora convencional. A continuación se muestran las dos máscaras que fueron necesarias para la fabricación del PCB central.

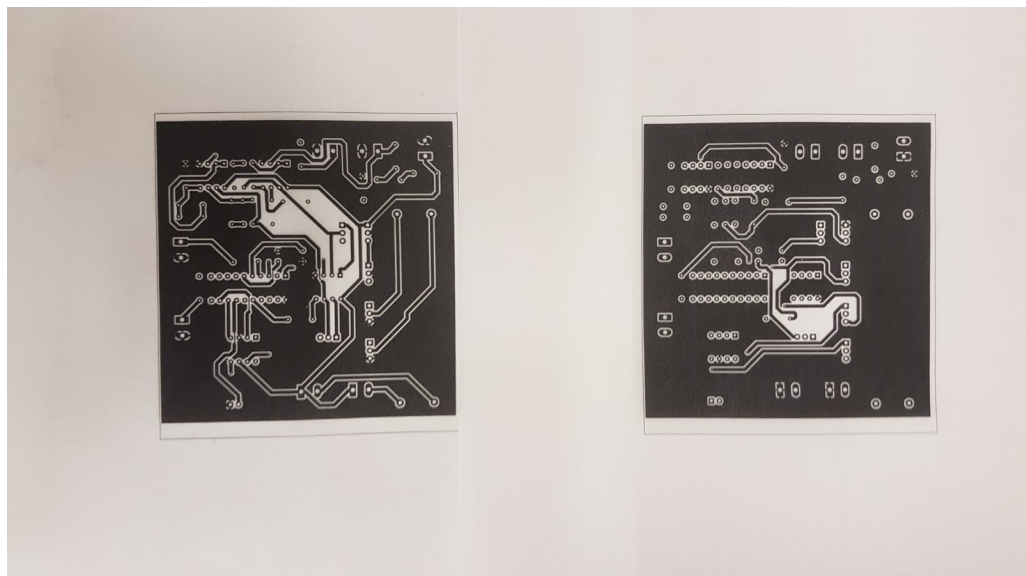


Figura 6.5 Máscaras del PCB de control de temperatura.

* **2do paso. Insolación.** Para este apartado, es necesario diferenciar las máscaras fabricadas con una impresora convencional (PCB control temperatura) y con el photoplotter (Lab-on-

PCB). Las máscaras impresas con photoplotter (o fotolitos) tienen mucha mayor resolución que los de las impresoras tradicionales, por lo que se usan para producir fotolitos de gran calidad y precisión, necesario para las máscaras de microsistemas. Es un proceso seco sin tinta, sin tóner y sin ningún otro producto químico, y la máscara se imprime en una lámina de poliéster reciclable. Otra diferencia respecto de los plotter convencionales es que la impresión debe hacerse en un espacio sellado a la luz o cuarto oscuro. Para las máscaras fabricadas con el photoplotter, se insola con una alineadora. Esta máquina, además de insolar, permite alinear máscaras de manera muy precisa.



Figura 6.6 Alineadora.

Tras alinear la máscara muy cuidadosamente, se procede a la insolación. La alineadora tiene rayos colimados, necesario para obtener paredes rectas en resinas altas, a diferencia de las insoladoras convencionales, las cuales tienen tubos fluorescentes no colimados, que inciden en la resina por todas las direcciones. La insolación se produce en seis pasos de 20 segundos. Una vez insolado por una cara, se repitió todo el proceso para la otra cara.

Para las máscaras impresas con un plotter convencional (en este caso para el PCB de control de temperatura) se utiliza una insoladora (o contact printer en inglés). Esta máquina no tiene alineadora por lo que hay que hacerlo a mano. Las máscaras procedentes de los plotter normales no tienen tanta resolución como los photoplotters pero no es necesario para la insolación de esta máquina. Primero se coloca la máscara de la cara de abajo, prestando especial atención a la que la orientación de la máscara sea correcta. Luego se coloca la de arriba, alineando con los pads y pines comunes. Una vez alineado correctamente, se coloca el PCB entre las dos máscaras, se baja la pestaña de vacío, tras la cual se produce un vacío que extrae todo el aire posible entre máscara y PCB, y tras ver que todo sigue alineado se baja la tapa. La insolación en este caso se produce de una sola vez, durante 2min 30seg. En este caso la insolación se produce por ambas caras a la vez, a diferencia que con la alineadora.

* **3er paso. Revelado.** Se sumerge la placa en una mezcla compuesta por sosa cáustica y agua

(líquido revelador) hasta que sea posible distinguir las pistas del diseño, tantas veces como sea necesario, enjuagando la placa cada vez que se saque de la mezcla. Sin embargo hay que tener cuidado de no sumergirlo más tiempo del necesario, pues el líquido revelador puede llevarse la resina que no ha sido insolada si está expuesto el tiempo suficiente. Para elaborar la mezcla de revelado, se vierten alrededor de 15mL de concentrado de sosa cáustica en 1L de agua.



Figura 6.7 Sosa cáustica.

- * **4º paso. Ataque químico.** La placa se introduce en una mezcla de 1/4 de agua oxigenada, 1/4 de agua fuerte y 1/2 de agua. La mezcla reacciona con el cobre que queda al descubierto (sin resina fotosensible). Se debe tener extremada precaución en este punto: se debe realizar este paso bajo un extractor de gases, con guantes de latex y bata de laboratorio, para evitar inhalar los gases de la reacción y evitar corrosión en las manos y la ropa.



Figura 6.8 Agua oxigenada y agua fuerte.

- * **5º paso. Eliminación de la resina restante.** Posterior al ataque químico, se limpia con acetona las pistas del circuito para retirar los restos de resina. Este paso es importante antes de realizar las soldaduras necesarias para la inserción de los componentes. Si no se va a soldar inmediatamente, es preferible retrasar este paso al momento previo de la soldadura, evitando la oxidación de las pistas que también dificulta la adhesión del estaño.

6.2 Fabricación de la placa de control de temperatura

Se siguieron los pasos anteriores para la fabricación del PCB. Para la impresión se utilizó un PCB de doble cara de 35 micras de cobre, al cual no es necesario aplicarle ningún tipo de resina epoxi. A continuación, las figuras muestran la placa tras el revelado, antes de ser perforada y soldada por delante y por detrás, y con todos los componentes soldados. Para la perforación, se usó una broca de 1 mm de diámetro para la mayoría de los componentes, y una broca de 1.5mm para las ranuras de las bornas y el par de resistencias de disipación.

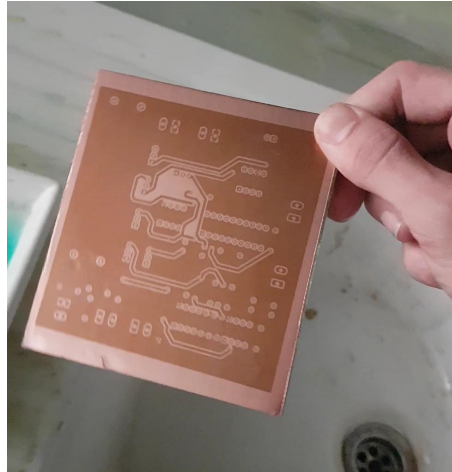


Figura 6.9 PCB tras el revelado.

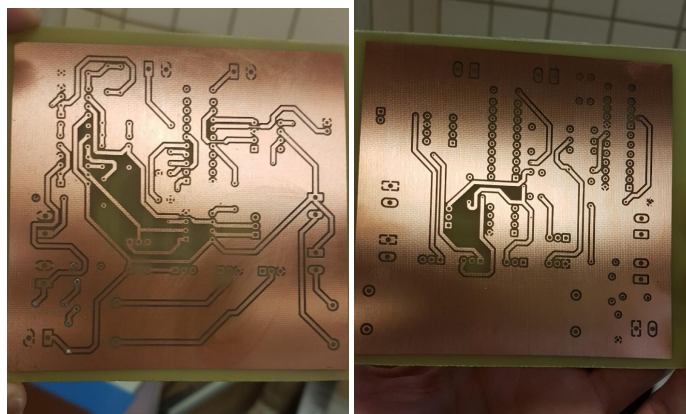


Figura 6.10 Parte superior e inferior del PCB antes de ser perforado.

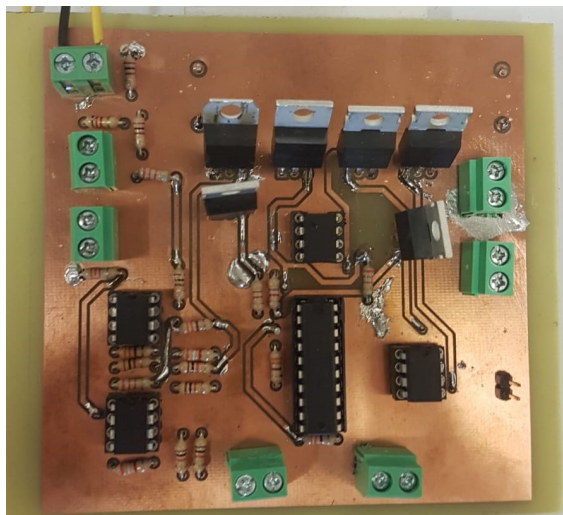


Figura 6.11 PCB con todos los elementos soldados.

6.3 Fabricación del Lab-on-PCB

En primer lugar se procedió al fresado de los microcanales en PMMA. El fresado se realizó con la fresadora CNC, en el laboratorio de microsistemas de la escuela.

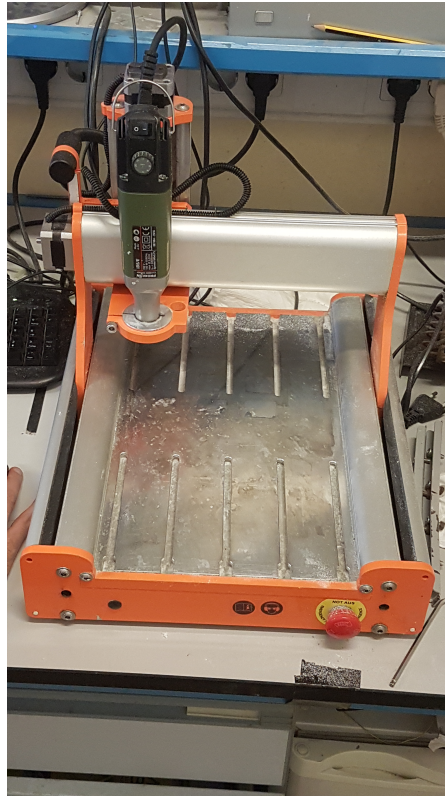


Figura 6.12 Fresadora CNC.

El procedimiento a seguir, partiendo del L-Edit es:

1. Exportar el archivo en formato DXF clicando en File->export->nombre-archivo->save
2. En el software Cut2D, para adaptar el diseño al programa de la fresadora se abre el archivo con Open File->nombre-archivo
3. Se ajustan las dimensiones correctamente en Material setup
4. Clicar en origin position para centrar el origen de coordenadas, y clicar en OK
5. Navegar hasta Edit Vectors, y clicar en OK.
6. Crear .crv
7. Con el software WinPC-NC USB, debe abrirse el archivo .crv.

Si todo ha ido correctamente, en el programa debe verse el recorrido que hará la broca de la fresadora, como se muestra a continuación:

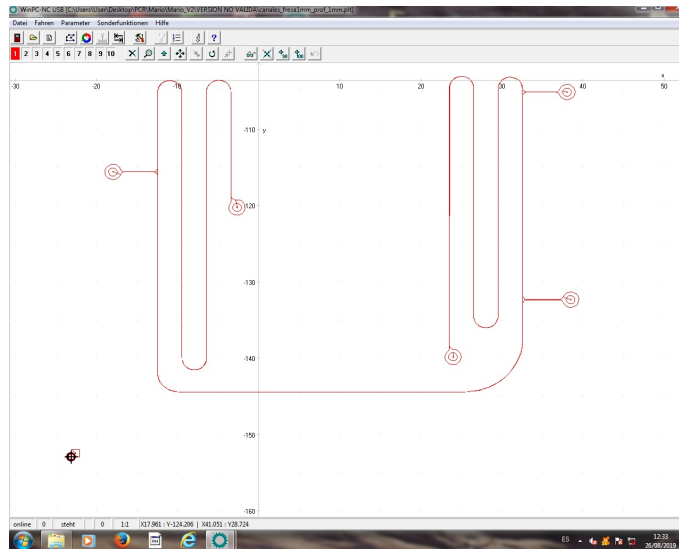


Figura 6.13 Recorrido de la broca desde el programa de fresado.

A continuación se deja una foto del metacrilato fresado

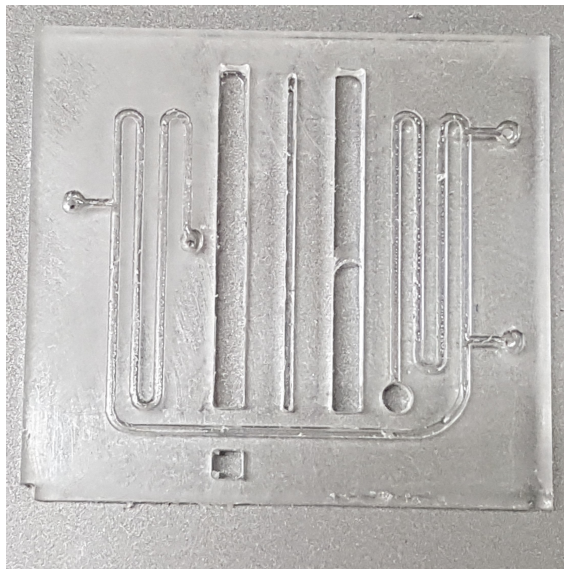


Figura 6.14 Metacrilato del Lab-on-PCB sobre fondo gris.

En cuanto a la fabricación del PCB, lo primero que se realizó fue el fresado de los huecos de las NTC y los huecos para el aislamiento térmico de las pistas. Una vez fresados los huecos, se realiza el corte de la placa. Para ello se siguió el mismo procedimiento ya descrito.

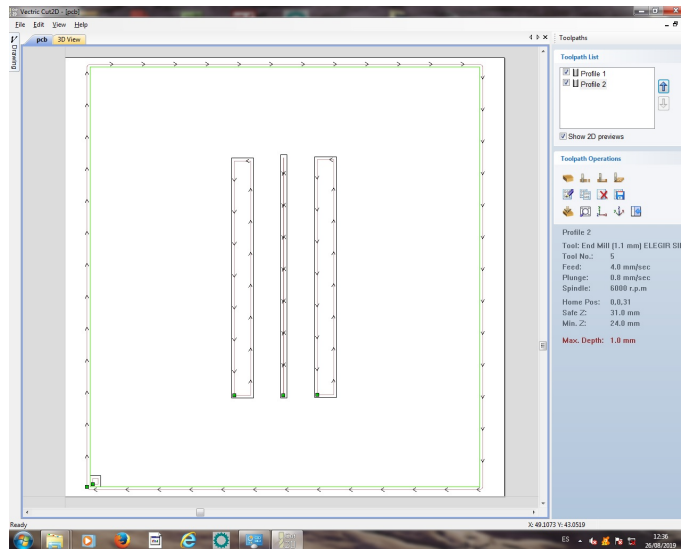


Figura 6.15 Fresado de los huecos en el PCB.

Acto seguido se procedió a la alineación, insolación, revelado y ataque químico por ambas caras del PCB. A continuación se muestra el resultado.

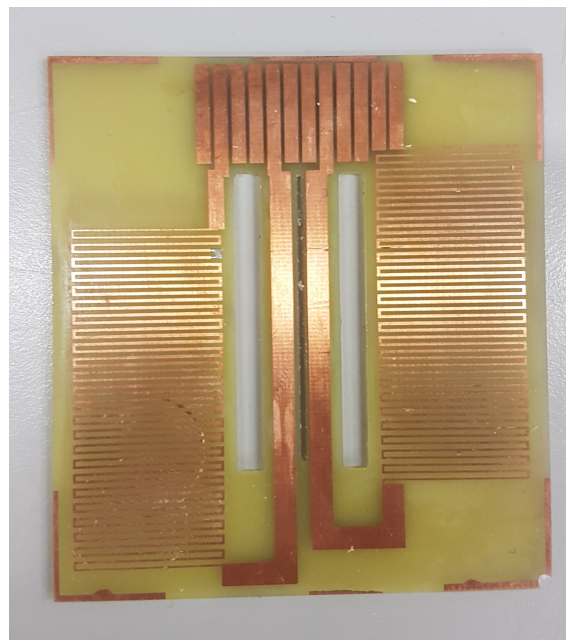


Figura 6.16 Calentador del Lab-on-PCB.

Nótese el pequeño arreglo con estaño que hubo que realizar en las pistas de calentamiento por una discontinuidad en el ataque químico.

Para realizar las soldaduras de la NTC se empleó un microscopio y un soldador de punta fina. A continuación se deja una fotografía del soldado de la NTC.

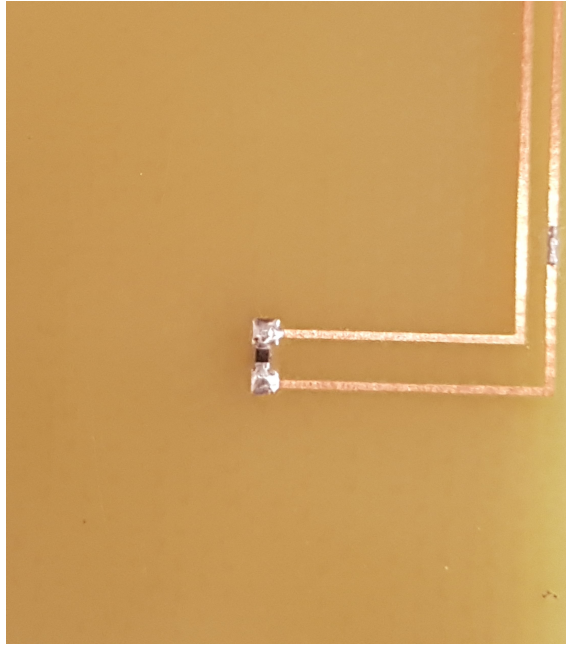


Figura 6.17 Detalle del soldado de la NTC en la cara posterior.

Se comprobó que la resistencia marcasse alrededor de los 10k Ohm desde las pistas superiores del Lab-on-PCB.

7 Programación del microcontrolador

En este capítulo se describe el software desarrollado e implementado en el microcontrolador (MSP430G2553) para automatizar el control de temperatura en el Lab-on-PCB. Para la descripción del lenguaje se utilizó Energía, un software de código abierto destinado al prototipado en la electrónica.

7.1 Especificaciones del software

La idea principal del control es que el microcontrolador transmita una señal a los drivers de los MOSFET mediante señales moduladas por ancho de pulso (PWM), de manera que mientras $T < T^*$ el duty cycle vaya aumentando cada periodo de tiempo t . Cuando T alcance el valor deseado T^* , se cortará el paso de la corriente por las pistas de calentamiento.

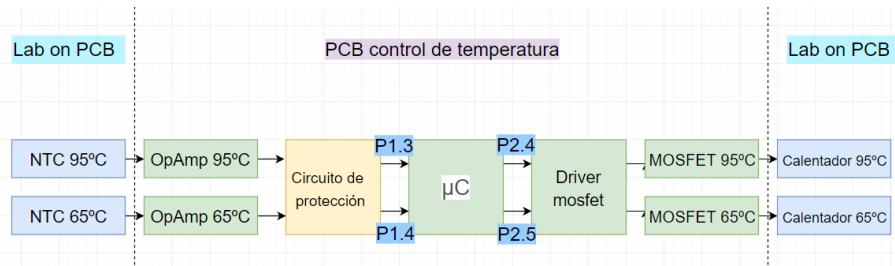


Figura 7.1 Esquema PCB control temperatura.

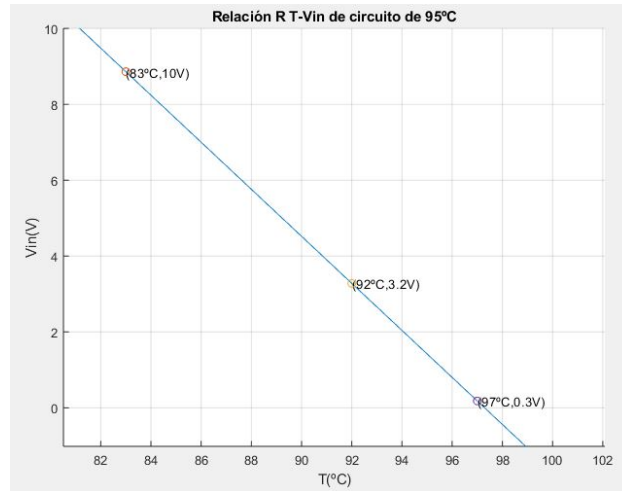
Como se comentó previamente en la memoria, a lo largo del diseño del prototipo surgió un problema en cuanto al voltaje de entrada al micro. Éste actúa en función de la tensión de salida del circuito de amplificación, y esta tensión de salida depende íntegramente del valor del punto A en el divisor de tensión. (Ver Figura 7.1). Cuando la temperatura de la NTC es cercana a $T_{amb} = 25^\circ\text{C}$, la tensión de salida del circuito de amplificación, tanto en el circuito de 65°C como el de 95°C ronda los 10V, mientras que el micro acepta hasta 3,5V.

El circuito de protección cancela todos los valores de tensión por encima de 3,3V, esto significa que hasta la temperatura equivalente a 3,3V en cada circuito, el microcontrolador no vería cambio a su entrada.

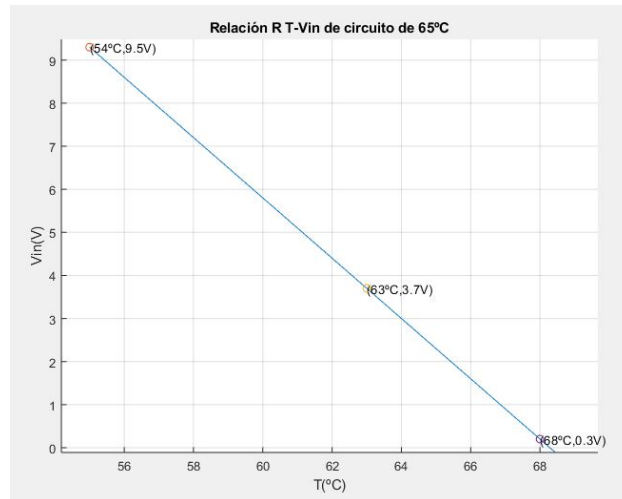
Simulando el circuito con las resistencias ajustadas podemos obtener la temperatura asociada a 3,5V para cada uno de los dos circuitos. Partiendo de la simulación del circuito, podemos simplificar la relación V-T como una curva del tipo

$$y = mx + n,$$

y sacando los parámetros m y n de la recta, obtenemos, para el circuito de 95°C :



y para el circuito de 65°C:



1

Esto significa que hasta 92°C y 63°C el microcontrolador no será capaz de controlar la temperatura, pero esto no supone un problema, ya que estas temperaturas se encuentran por debajo del rango de T^* por lo que habrá que calentar en cualquier caso. Además, el valor de entrada al micro está limitado por los amplificadores operacionales, los cuales saturan alrededor de 0.8V, por tanto podemos diferenciar si a la entrada es $V_{in} \leq 0.8V \Rightarrow T < T^*$ (calentar) y si $V_{in} \geq 0.8V \Rightarrow T > T^*$ (dejar de calentar).

7.2 Descripción del programa

Con las especificaciones de diseño del apartado anterior, se decidió optar por una máquina de moore para el control de la temperatura. Como el micro debe controlar los dos circuitos simultáneamente, se optó por definir cada uno de los estados en los que podría encontrarse cada circuito y actuar en función de eso únicamente. Se definieron un total de nueve estados. A continuación se muestra una tabla con los nueve estados definidos y las acciones correspondientes. Para ello se definieron una serie de temperaturas de referencia, siendo $T_{c65} = 63^\circ\text{C}$ $T_{c95} = 90^\circ\text{C}$ $T_{65}^* = 66^\circ\text{C}$ $T_{95}^* = 96^\circ\text{C}$. Para estas temperaturas existen unos valores de tensión asociados, pero se ha utilizado uno de los pines digitales del micro, por lo que cada valor de tensión discreto desde

¹ Esta no es una representación muy fiel del comportamiento del circuito pero nos da una idea de cuándo el microcontrolador empieza a ver cambios en el voltaje a la entrada (alrededor de 90°C y 60°C), dejando ese rango de voltajes de 3.3V hasta 0.8V para el control de la temperatura.

0.8V a 3.6V se asocia a un número entero desde 0 a 1023. Los valores de referencia para 95°C y para 65°C se ajustaron a 530 y 380 respectivamente. Esto equivale aproximadamente a 96°C y 66°C, ya que en el prototipo final se asume que el metacrilato absorberá parte del calor por lo que se decidió subir la referencia a un grado más. Se asoció el valor 50 (equivalente a 0.2V) para diferenciar si el sistema se encontraba por debajo de las temperaturas de control $T_{c_{65}} = 63^{\circ}\text{C}$ $T_{c_{95}} = 90^{\circ}\text{C}$.

Tabla 7.1 Tabla de estados del programa de control de temperatura.

	T_{95}	T_{65}	Acción 95	Acción 65
Estado 1	$T \leq T_{c_{95}}$	$T \leq T_{c_{65}}$	Aumentar DC	Aumentar DC
Estado 2	$T > T_{c_{95}}$	$T \leq T_{c_{65}}$	Aumentar DC	Aumentar DC
Estado 3	$T > T_{c_{95}}$	$T > T_{c_{65}}$	Aumentar DC	Aumentar DC
Estado 4	$T > T_{95}^*$	$T \leq T_{c_{65}}$	Cortar corriente	Aumentar DC
Estado 5	$T > T_{95}^*$	$T_{c_{65}} < T < T_{65}^*$	Cortar corriente	Aumentar DC
Estado 6	$T_{c_{95}} < T < T_{95}^*$	$T > T_{65}^*$	Aumentar DC	Cortar corriente
Estado 7	$T \leq T_{c_{95}}$	$T_{c_{65}} < T < T_{65}^*$	Aumentar DC	Aumentar DC
Estado 8	$T \leq T_{c_{95}}$	$T > T_{65}^*$	Aumentar DC	Cortar corriente
Estado 9	$T > T_{95}^*$	$T > T_{65}^*$	Cortar corriente	Cortar corriente

Tras numerosas pruebas con el prototipo, se decidió iniciar los PWM con un DC del 10%, e ir aumentando gradualmente con cada periodo de tiempo t . El DC está limitado en cada estado al 90%, para evitar sobrecalentamientos. Se considera que cada pista está a la temperatura deseada cuando $T > T^*$, y cuando eso pase, para cada circuito se encenderá un LED para indicar que la pista respectiva está lista. Cuando las dos hayan llegado a su T^* el microcontrolador enviará una señal al PCB de control de inyección indicando que las pistas están preparadas para la impulsión. La asignación de pines del microcontrolador se realizó teniendo en cuenta qué entradas y salidas debían considerarse digitales o analógicas. La siguiente figura, procedente de la web de Energía, muestra qué pines son de entrada/salida analógica o digital.

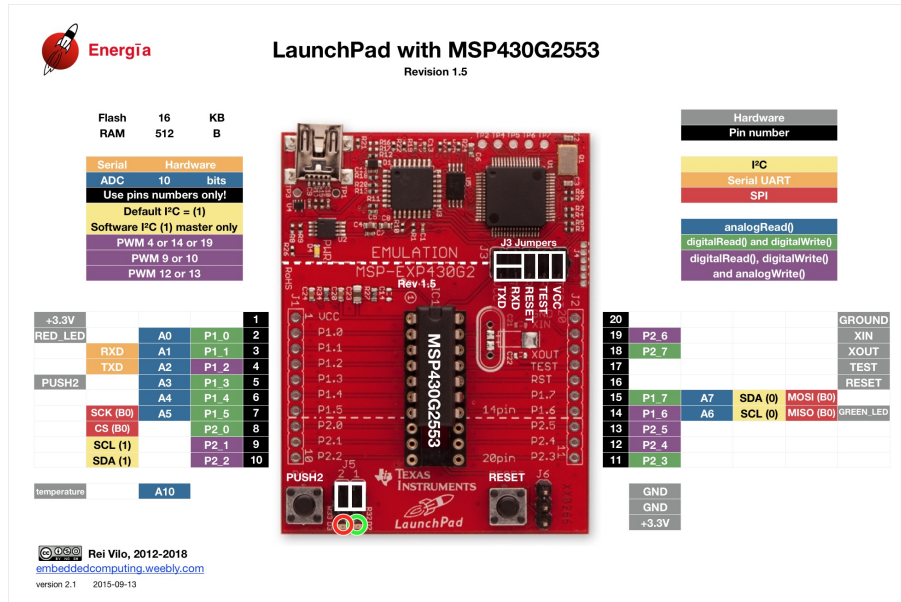


Tabla 7.2 Tabla de los pines usados.

Utilidad	Pin	Tipo de señal
Led 95	P1.1	Digital
Led 65	P1.2	Digital
Voltaje de salida del OpAmp (65°C)	P1.3	Digital
Voltaje de salida del OpAmp (95°C)	P1.4	Digital
Señal de control del MOSFET (65°C)	P2.4	Analógica
Señal de control del MOSFET (95°C)	P2.5	Analógica
Señal de control del sistema de inyección	P1.6	Digital

Las únicas señales estrictamente analógicas son las señales de disparo de los Driver.

8 Pruebas de los distintos subsistemas

En este capítulo se dan a conocer una serie de pruebas que fueron necesarias para el desarrollo de cada uno de los subsistemas.

8.1 Comparación de medidas NTC/Hot-plate/Termopar

Una de las tareas tras la fabricación del lab-on-PCB fue calentar las pistas con el Hot-Plate hasta llevarlas a las temperaturas objetivo, y comprobar qué diferencia de temperatura se producía entre la temperatura según el hot-plate en la parte posterior del PCB y la medida del termopar en la parte superior del PCB, en la NTC.

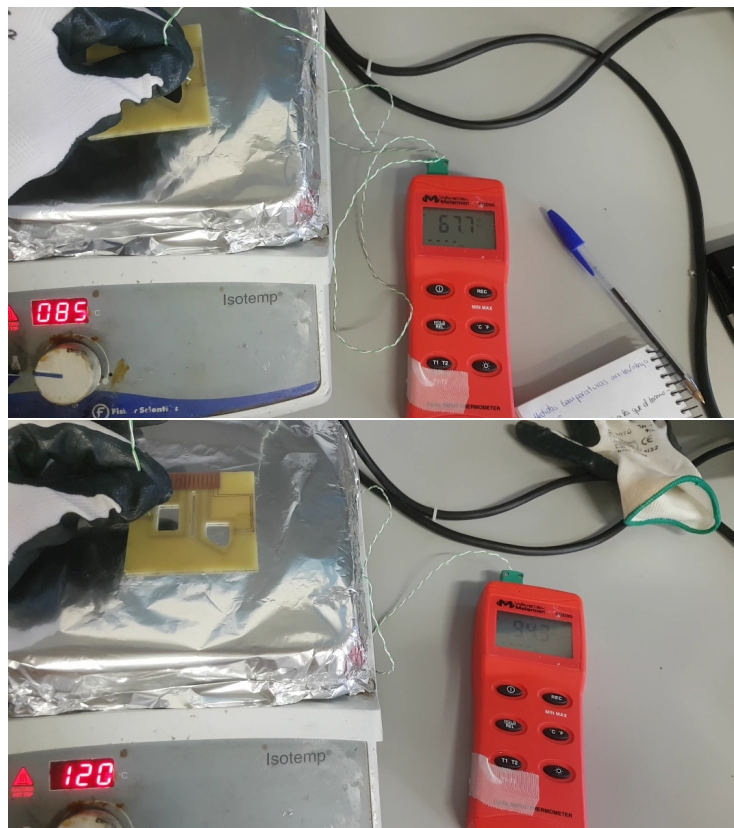


Figura 8.1 Diferencia de temperatura entre la marcada en el hot-plate y el termopar.

Como se aprecia en la figura anterior, para que el termopar marcara alrededor de 95°C se debía aportar una temperatura de 120°C en el hot-plate, y para 65°C hacía falta aportar 85°C . Debido a las numerosas condiciones de contorno: la presencia del PCB, del aluminio, la dificultad de la toma de datos y la incertidumbre de una calibración correcta del dispositivo de medida, hacen que los datos no sean muy fiables. Se procedió entonces a realizar otro experimento.

El siguiente experimento se trata de medir la resistencia que marca el multímetro y compararla con la fórmula de la NTC. Con estas medidas, se calculó tanto la temperatura teórica en función de la resistencia experimental como la resistencia teórica en función de la temperatura experimental, tomando la temperatura experimental como la del termopar, y la resistencia experimental como la que se marcaba en el multímetro. Se realizaron dos experimentos. En el primero de ellos se obtuvo una T_{exp} y una R_{exp} . En base a estos números, con la fórmula de la NTC, se obtuvo una resistencia teórica de $R_t(T)$ y una temperatura teórica de $T_t(R)$, siendo $\Delta R = R_t - R_{exp}$ y $\Delta T = T_t - T_{exp}$.

T_{exp}	R_{exp}	T_t	R_t	ΔT	ΔR
67°C	2222Ω	69°C	2365Ω	2°C	143Ω

Insatisfecho con los resultados, dada la dificultad de la toma de datos (ya que el valor de cada dispositivo se actualiza cada segundo), se repitió el experimento. El siguiente experimento se realizó a una temperatura $T_{exp}=72.2^{\circ}\text{C}$, para la cual el multímetro marcaba una $R_{exp} = 2060\Omega$. Siguiendo el mismo procedimiento se obtuvieron estos números.

T_{exp}	R_{exp}	T_t	R_t	ΔT	ΔR
72.2°C	2060Ω	72°C	2067Ω	0.2°C	7Ω

En vista a los resultados de este experimento respecto a los del anterior, se optó por fiarse de las medidas de la NTC en cuanto a la temperatura frente a los del hot-plate y el termopar.

8.2 Pruebas del calentador

Una vez fabricados el Lab-on-PCB y el PCB de control de temperatura, y el programa del microcontrolador puesto a punto, se dio paso a probar el circuito de calentamiento.

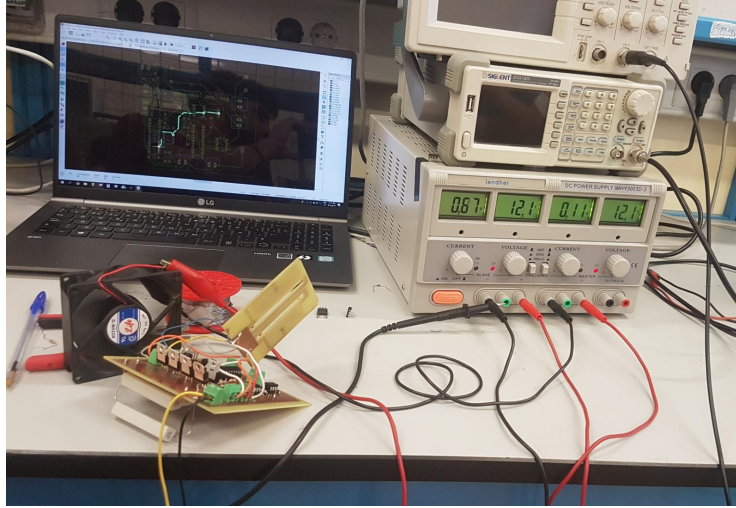


Figura 8.2 Pruebas del calentador.

En un principio, el circuito de calentamiento de 65°C llegaba a su T^* al poco tiempo (unos 40 segundos), pero el circuito de calentamiento de 95°C se quedaba por debajo de su T^* , estando ya su PWM al máximo (90 %) y habiendo pasado un tiempo razonable (alrededor de dos minutos). Se decidió entonces soldar en paralelo otra resistencia de disipación de 10 Ω de manera que pasase más corriente (se recuerda que originalmente cada circuito tenía en serie a su calentador una resistencia de disipación de calor de 10 Ω). Esto solucionó satisfactoriamente el problema, además, con esta configuración el circuito de 95°C llegaba más rápido a su T^* que el circuito de 65°C. Se comprobó que bajo la carga máxima, es decir, con los dos circuitos calentando, el sistema pedía un total de 1.8A aproximadamente. La corriente de cada calentador se obtuvo de forma empírica conectándolos por separado. Las intensidades de cada uno son $I_{65} = 0.54A$ y $I_{95} = 1.23A$, valores esperados ya que se encuentran por debajo de $I_{max,65} = 0.88A$ y $I_{max,95} = 1.41A$ al estar limitado el PWM entre el 10 % y 90 %.

Con esta configuración, los dos circuitos llegan a sus respectivas T^* y empiezan a regular en un minuto aproximadamente. Una vez alcanzadas sus temperaturas, se tomó una foto a cada pista con una cámara termográfica para verificar que las pistas se encontraban a las temperaturas de diseño.

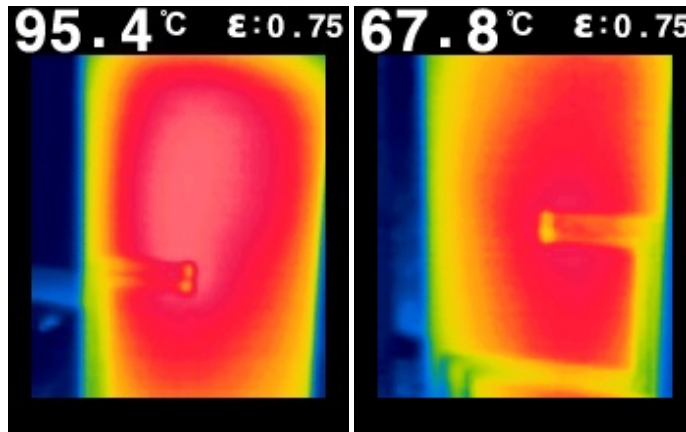


Figura 8.3 Capturas de la cámara termográfica en las pistas de 95°C y 65°C.

Como se aprecia en las capturas, las temperaturas se alcanzaron de manera satisfactoria.

8.3 Pruebas de microfluídica

Tras la fabricación del microcanal en PMMA, el lab-on-PCB, el pegado de ambos y el sistema de impulsión puesto a punto, se probó que el fluido pasase de un lado a otro de forma cíclica y sin mucha diferencia en la posición en cada impulsión. Las pruebas fueron satisfactorias, ya que el fluido se situaba prácticamente en el mismo segmento del microcanal. En las figuras siguientes se muestra el líquido (en este caso agua con tinte verde) en las posiciones de denaturación y recocido.

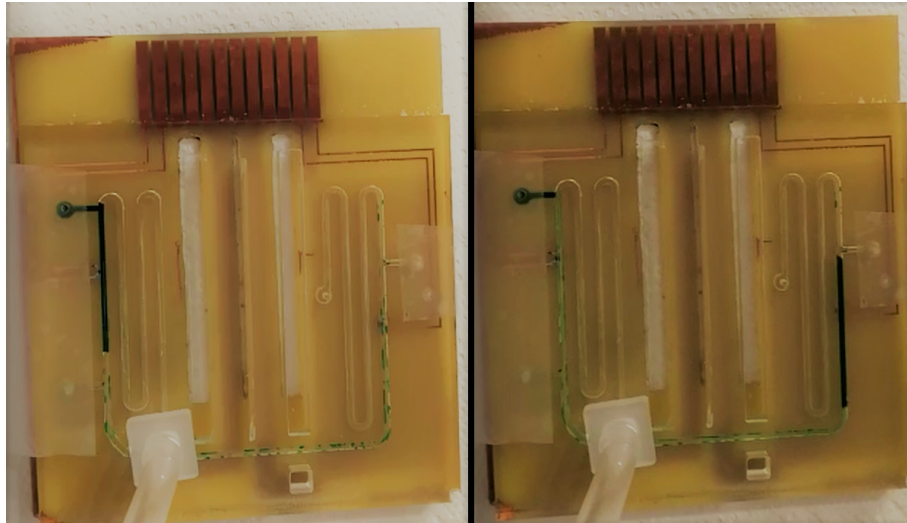


Figura 8.4 Sistema de inyección en fase de recocido y denaturación.

8.4 Pruebas del sistema completo

Tras la puesta a punto de todos los elementos del sistema, se procedió a hacer la prueba de funcionamiento del termociclador. La prueba consiste en ver que se calienten las dos pistas a sus temperaturas de diseño, para lo cual se encenderán los dos LED simultáneamente. Una vez éstas llegan a sus temperaturas, el micro mandará un nivel bajo a través de los pines hacia el PCB de control de inyección (en la imagen, se usó su placa de pruebas ya que daba problemas de última hora que no han sido resueltos a tiempo), la cual mandará una orden al motor para que realice los ciclos a los que ha sido programado. Las pruebas fueron satisfactorias, y con estos resultados se concluyó este proyecto.

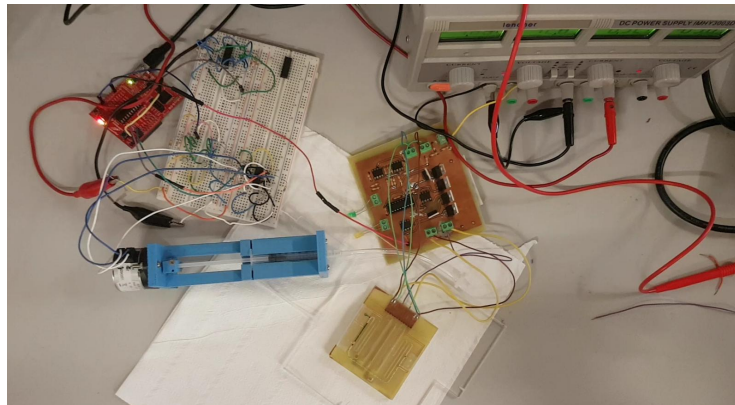


Figura 8.5 Prueba del sistema completo.

9 Conclusiones y Trabajos futuros

El objetivo principal del proyecto fue el diseño y la fabricación de un sistema electrónico de control de fluidos en recirculación, o termociclador, para aplicaciones *lab-on-a-chip*. Se ha demostrado la capacidad del sistema de llevar el fluido a dos temperaturas distintas y de impulsarlo satisfactoriamente entre dos áreas en un mismo PCB de pequeñas dimensiones. Además, se han logrado los siguientes objetivos secundarios:

- * **Bajo coste.** Para la fabricación del sistema, se han utilizado materiales de bajo coste como el FR4, metacrilato y cobre. Se ha minimizado también el número de componentes electrónicos, que a lo sumo alcanzan un precio total de 11€. Junto con la placa de cobre a doble cara, el metacrilato y los materiales de fabricación, el precio se sitúa sobre los 25€, a lo que habría que sumarle también la mano de obra.
- * **Fabricación sencilla.** Los procesos de fabricación empleados en este proyecto son los estándar para la fabricación de PCB MEMS, como la fotolitografía y el *wet etching*. Para el mecanizado del metacrilato se utilizó la fresadora CNC del departamento de microsistemas.
- * **Simplicidad del diseño.** Desde la elección de un termociclador de dos temperaturas, pasando por el diseño del Lab-on-pcb, del circuito electrónico, del PCB de control de temperatura y de la programación del microcontrolador se ha priorizado la simplicidad ante otros factores que podrían complejizar el diseño de forma contraproducente.

Se enlistan también a continuación posibles ampliaciones que mejorarán de forma considerable el sistema:

- * **Implementación de un pulsador de inicio en el sistema.** Una mejora inmediata del sistema sería la adición de un pulsador, el cual al ser activado diese pie al proceso de calentamiento. Actualmente, al conectar a alimentación el sistema, éste comienza inmediatamente a proporcionar corriente a los circuitos de calentamiento, por lo que no es la solución más cómoda ni segura. No fue posible añadirlo a tiempo debido a falta de tiempo (ya que no surgió la idea hasta ya muy avanzado el proyecto, y sería necesario la fabricación de una nueva PCB central).
- * **Optimización del programa del microcontrolador.** El programa utilizado para el control de temperaturas podría ser más compacto y utilizar menos estados. El programa usado, aunque extenso, es el que dio resultado en una primera aproximación, pero es posible su optimización quitando estados y varias líneas de código.
- * **Posibilidad de reprogramación del microcontrolador sin tener que sacarlo del zócalo.** Esto supondría una mejora inmediata del sistema; permitiría el cambio de elementos del programa de manera mucho más rápida, ya que se pierde bastante tiempo si se quiere ajustar algún parámetro específico del programa.
- * **Integración de una interfaz gráfica en el sistema.** La implementación de un display supondría un buen avance en el proyecto en cuanto a la interfaz del sistema con el usuario. Este display podría ser capaz de mostrar la evolución de la temperatura de los canales en tiempo real, así como el número de ciclos, estimación del número de copias resultadas, etc.
- * **Control sobre parámetros del ensayo.** La posibilidad de elegir parámetros en el ensayo de PCR tales como las temperaturas o el número de ciclos supondría una mejora funcional considerable. Para ampliar el rango de temperaturas, para cada NTC podrían usarse amplificadores

rail-to-rail(por ejemplo el MCP6442), con el objeto de obtener más rango de tensiones (en nuestro caso, en el rango de V_{out} de 0 a 0.8V no somos capaces de diferenciar temperaturas). Con esta implementación se abarca también la posibilidad de operar en distintos programas, haciéndolo más versátil para por ejemplo permitir la amplificación de más tipos de genes (a parte de los de ratón), optimizar el funcionamiento para la obtención de más copias, u otros usos relacionados con el termociclador, como por ejemplo facilitar otras reacciones sensitivas a la temperatura, o diagnóstico rápido [11].

10 Anexo

Programa del microcontrolador

```
1 int ref95 = 530; //referencia de temperatura en el ADC, "
  valor NTC" para temperatura deseada
2 float n95=25; //inicio PWM a 25%
3 int ref65 = 380; //referencia de temperatura en el ADC, "
  valor NTC" para temperatura deseada
4 float n65=25; //inicio PWM a 25%
5
6 int m=0;
7 int n=0;
8
9 int f1 = 0 ;
10 int f2 = 0;
11 int f3 = 0;
12 int f4 = 0;
13 int f5 = 0;
14 int f6 = 0;
15 int f7 = 0;
16 int f8 = 0;
17 int f9 = 0;
18 int f10 = 0;
19 int f11 = 0;
20 int f12 = 0;
21 int f13 = 0;
22 int f14 = 0;
23 int f15 = 0;
24 int f16 = 0;
25 int f17 = 0;
26 int f18 = 0;
27 int f19 = 0;
28 int f20 = 0;
29 int i = 0;
30
31 int g1 = 0 ;
32 int g2 = 0;
33 int g3 = 0;
34 int g4 = 0;
35 int g5 = 0;
36 int g6 = 0;
37 int g7 = 0;
38 int g8 = 0;
```

```
39 int g9 = 0;
40 int g10 = 0;
41 int g11 = 0;
42 int g12 = 0;
43 int g13 = 0;
44 int g14 = 0;
45 int g15 = 0;
46 int g16 = 0;
47 int g17 = 0;
48 int g18 = 0;
49 int g19 = 0;
50 int g20 = 0;
51 int j = 0;
52
53
54
55
56
57
58 void setup() {
59   // initialize serial communication at 9600 bits per second:
60   //Serial.begin(9600); // msp430g2231 must use 4800
61   pinMode(P1_6, OUTPUT);
62   pinMode(P2_4, OUTPUT);
63   pinMode(P2_5, OUTPUT);
64   pinMode(P1_1, OUTPUT);
65   pinMode(P1_2, OUTPUT);
66
67
68 }
69
70 // the loop routine runs over and over again forever:
71 void loop() {
72   // read the input on analog pin A3:
73   int medida95 = analogRead(A3); //leemos temperatura, valor
       NTC
74   int medida65 = analogRead(A4); //leemos temperatura, valor
       NTC
75   //int medida95 = LDRValue95; //* (1000.0 / 1023.0);
76   digitalWrite(P1_1, LOW);
77   digitalWrite(P1_2, LOW);
78   digitalWrite(P1_6, HIGH);
79
80   f20 = f19;
81   f19 = f18;
82   f18 = f17;
83   f17 = f16;
84   f16 = f15;
85   f15 = f14;
86   f14 = f13;
87   f13 = f12;
88   f12 = f11;
89   f11 = f10;
90   f10 = f8;
91   f9 = f8;
92   f8 = f7;
93   f7 = f6;
```

```
94 f6 = f5;
95 f5 = f4;
96 f4 = f3;
97 f3 = f2;
98 f2 = f1;
99 f1 = medida95;
100
101
102 int media95 = (f1+f2+f3+f4+f5+f6+f7+f8+f9+f10+f11+f12+f13+
    f14+f15+f16+f17+f18+f19+f20)/20;
103
104 g20 = g19;
105 g19 = g18;
106 g18 = g17;
107 g17 = g16;
108 g16 = g15;
109 g15 = g14;
110 g14 = g13;
111 g13 = g12;
112 g12 = g11;
113 g11 = g10;
114 g10 = g8;
115 g9 = g8;
116 g8 = g7;
117 g7 = g6;
118 g6 = g5;
119 g5 = g4;
120 g4 = g3;
121 g3 = g2;
122 g2 = g1;
123 g1 = medida65;
124
125 int media65 = (g1+g2+g3+g4+g5+g6+g7+g8+g9+g10+g11+g12+g13+
    g14+g15+g16+g17+g18+g19+g20)/20;
126 //delay (500);
127 int error95 = ref95-media95; //calculamos error
128 int error65 = ref65-media65; //calculamos error
129
130 //analogWrite(P1_2, 255);
131 if (media95 <= 50 && media65 <= 50){ // Estado 1
132     analogWrite(P2_5, n65);
133     analogWrite(P2_4, n95);
134     digitalWrite(P1_2, LOW);
135     digitalWrite(P1_1, LOW);
136     digitalWrite(P1_6, HIGH);
137     n65=n65+1;
138     n95=n95+1;
139     if (n65>230){n65=230;}
140     if (n95>230){n95=230;}
141     //delay(1000);
142 }
143 if (error95 < 0 && media65 <= 50) { // Estado 2
144     analogWrite(P2_5, n65);
145     analogWrite(P2_4, n95);
146     digitalWrite(P1_1, LOW);
147     digitalWrite(P1_2, LOW);
148     digitalWrite(P1_6, HIGH);
```

```
149     n65=n65+1;
150     n95=n95+1;
151     if (n65>230){n65=230;}
152     if (n95>230){n95=230;}
153     //delay(1000);
154     }
155     if (error95 < 0 && error65 <0) { // Estado 3
156     analogWrite(P2_5, n65);
157     analogWrite(P2_4, n95);
158     digitalWrite(P1_2, LOW);
159     digitalWrite(P1_1, LOW);
160     digitalWrite(P1_6,HIGH);
161     n65=n65+1;
162     n95=n95+1;
163     if (n65>230){n65=230;}
164     if (n95>230){n95=230;}
165     //delay(1000);
166     }
167
168     if (error95 >= 0 && media65 <= 50) { // Estado 4
169     analogWrite(P2_5, n65);
170     analogWrite(P2_4, 0);
171     digitalWrite(P1_2, LOW);
172     digitalWrite(P1_1, HIGH);
173     digitalWrite(P1_6,HIGH);
174     n65=n65+1;
175     if (n65>230){n65=230;}
176     if (n95>230){n95=230;}
177     //delay(1000);
178     }
179     if (error95 >= 0 && error65 <0) { // Estado 5
180     analogWrite(P2_5, n65);
181     analogWrite(P2_4, 0);
182     digitalWrite(P1_2, LOW);
183     digitalWrite(P1_1, HIGH);
184     digitalWrite(P1_6,HIGH);
185     n65=n65+1;
186     if (n65>230){n65=230;}
187     if (n95>230){n95=230;}
188     //delay(1000);
189     }
190     if (error65 >= 0 && error95 <0) { // Estado 6
191     analogWrite(P2_5, 0);
192     analogWrite(P2_4, n95);
193     n95=n95+1;
194     digitalWrite(P1_1, LOW);
195     digitalWrite(P1_2, HIGH);
196     digitalWrite(P1_6,HIGH);
197     if (n65>230){n65=230;}
198     if (n95>230){n95=230;}
199     //delay(1000);
200     }
201
202
203     if (error65 < 0 && media95 <= 50) { // Estado 7
204     analogWrite(P2_5, n65);
205     analogWrite(P2_4, n95);
```

```
206     digitalWrite(P1_2, LOW);
207     digitalWrite(P1_1, LOW);
208     digitalWrite(P1_6, HIGH);
209     n65=n65+1; //suma de 10 en 10
210     n95=n95+1;
211     if (n65>230){n65=230;}
212     if (n95>230){n95=230;}
213     //delay(1000);
214     }
215
216     if (error65 >= 0 && media95 <= 50) { // Estado 8
217         analogWrite(P2_5, 0);
218         analogWrite(P2_4, n95);
219         digitalWrite(P1_1, LOW);
220         digitalWrite(P1_2, HIGH);
221         digitalWrite(P1_6, HIGH);
222         n95=n95+1;
223         if (n65>230){n65=230;}
224         if (n95>230){n95=230;}
225         //delay(1000);
226         }
227
228     if ((error65 >= 0 && error95 >= 0) && (media65 > 50 &&
        media95 > 50)) { // Estado 9
229         analogWrite(P2_4, 0);
230         analogWrite(P2_5, 0);
231         digitalWrite(P1_2, HIGH);
232         digitalWrite(P1_1, HIGH);
233         m=1;}
234     if (m==1 && n==0){
235         digitalWrite(P1_6, LOW);
236         digitalWrite(P1_2, HIGH);
237         digitalWrite(P1_1, HIGH);
238         delay(2000);
239         digitalWrite(P1_6, HIGH);
240         n=1;
241     }
242 }
```


Bibliografía

- [1] *Steps to fabrication of mems*, 2013.
- [2] *What is mems?*, 2017.
- [3] *Microfluidics market 2019-global industry trends, share, growth insight, size, competitive analysis, statistics, regional, and global forecast to 2024*, The Express Wire (2019).
- [4] Carmen Aracil, Francisco Perdigones, José Miguel Moreno, Antonio Luque, and José Manuel Quero, *Portable lab-on-pcb platform for autonomous micromixing*, *Microelectronic Engineering* **131** (2015), 13–18.
- [5] N Blow, *The present and future role of microfluidics in biomedical research*, *Nat Methods* (2014), no. 507, 181–189.
- [6] H.P. et al. Chou, *Fluidigm corporation. microfabricated elastomeric valve and pump systems*, WO (2001), no. 2001001025 A3.
- [7] Yuk Kee Cheung David Steinmiller Vincent Linder Hesam Parsa Curtis D Chin, Tassanee-wan Laksanasopin, *Microfluidics-based diagnostics of infectious diseases in the developing world*, *Nature Medicine* (2011), no. 17, 1015–1019.
- [8] G. et al. Davis, *Abbott laboratories. apparatus and methods for analyte measurement and immunoassay*, WO (2003), no. 2003076937 A3.
- [9] L. Pagel ; S. Gabmann, *Microfluidic systems in pcb technology*.
- [10] Lilit Garibyan and Nidhi Avashia, *Research techniques made simple: Polymerase chain reaction (pcr)*, *Journal of Investigative Dermatology* (2013), no. 133.
- [11] James A Higgins, Shanavaz Nasarabadi, Jeffrey S Karns, Daniel R Shelton, Mary Cooper, Aiah Gbakima, and Ronald P Koopman, *A handheld real time thermal cycler for bacterial pathogen detection*, *Biosensors and Bioelectronics* **18** (2003), no. 9, 1115–1123.
- [12] Inc (OPKO Inc) Linder, V. et al. Claros Diagnostics, *Fluid mixing and delivery in microfluidic systems*, WO (2011), no. 2011066361 A1.
- [13] José Miguel Moreno López, *Introducción a los pcb-mems*.
- [14] A Luque, G Flores, F Perdigones, D Medina, J Garcia, and JM Quero, *Single axis accelerometer fabricated using printed circuit board techniques and laser ablation*, *Sensors and Actuators A: Physical* **192** (2013), 119–123.
- [15] Mullis, (1990).
- [16] V.K. et al Pamula, *Advanced liquid logic, inc, a wholly owned subsidiary of illumina, inc. methods and apparatus for manipulating droplets by electrowetting-based techniques*, WO (2004), no. 2004030820 A2.
- [17] E.K. et al Sackmann, *The present and future role of microfluidics in biomedical research*, *Nature* (2014), no. 507, 181–189.
- [18] et al. Saiki RK, *A novel method for the prenatal diagnosis of sickle cell anemia*, *American Society Human Genetics* (1985).
- [19] Faloon F et al. Saiki RK, Scharf S, *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*, *Science* (1985), no. 230(4732), 1350–1354.

- [20] Stoffel S et al. Saiki RK, Gelfand DH, *Primer-directed enzymatic amplification of dna*, Science (1988), no. 239, 487–491.
- [21] Oscar Jesus Torrejón Yuste; Francisco Perdigones Sanchez, *Diseño, fabricación y caracterización de un sensor de caudal para aplicaciones pcb-mems [proyecto fin de carrera]*, Universidad de Sevilla (2011).
- [22] Mohamed Souilah, Abdelhafid Chaabi, Francisco Perdigones, Jose Manuel Quero, Guadalupe Flores, and Mohamed Ras Lain, *Fabrication process for pcbmems capacitive pressure sensors using the cu layer to define the gap*, IEEE Sensors Journal **16** (2015), no. 5, 1151–1157.
- [23] Óscar Jesús Torrejón Yuste, *Diseño, fabricación y caracterización de un sensor de caudal para aplicaciones pcb-mems*.
- [24] Lisa R. Volpatti¹ and Ali K. Yetisen, *Commercialization of microfluidic devices*, Nature.
- [25] Damhorst G Ni H Vaid A Rodriguez W Bashir R. Watkins NN, Hassan U, *Microfluidic cd4+ and cd8+ t lymphocyte counters for point-of-care hiv diagnostics using whole blood.*, Science Translational Medicine (2013), no. 214.